

*В.Б. Климович¹, А.А. Пиневиц^{1,2}, И.В. Смирнов¹, И.В. Грязева¹, И.Ю. Крутецкая¹,
О.А. Шашкова¹, Л.А. Терехина¹, А.Ю. Столбовая¹, Н.Л. Вартамян¹, М.П. Самойлович^{1,2}*

Перспективы применения антител против эндоглина (CD105) для визуализации и антиангиогенной терапии опухолей

¹ФГБУ «РНЦРХТ им. ак. А. М. Гранова» Минздрава России,
²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

В течение последних лет получены данные, указывающие на эффективность методов, основанных на применении моноклональных антител (МКАТ) против маркеров сосудистого эндотелия для визуализации очагов злокачественного роста и адресной доставки к ним терапевтических агентов. Одним из таких маркеров является эндоглин (CD105), который служит ключевым элементом, определяющим состояния покоя или активации клеток эндотелия. Эндоглин с высокой плотностью экспрессирован на эндотелии сосудов растущих опухолей. В лаборатории гибридной технологии РНЦ РХТ им. акад. А. М. Гранова создана первая в стране панель МКАТ против эндоглина. На основе этих МКАТ разработан метод иммуноферментного анализа, позволяющий определять концентрацию растворимого эндоглина в циркулирующей крови и других биологических жидкостях. В опытах с культивируемыми клетками эндотелия показано, что МКАТ способны связываться с эндоглином на клеточной мембране и оставаться на поверхности клеток в течение нескольких часов. В течение первых 30 мин часть комплексов эндоглина с МКАТ погружаются в цитоплазму клеток и могут быть обнаружены в составе эндосом. В перспективе на основе полученных МКАТ могут быть разработаны реагенты, обеспечивающие адресную доставку изотопных меток как на мембрану клеток эндотелия, так и в их цитоплазму.

Ключевые слова: эндоглин, CD105, опухоли, эндотелий, интернализация, визуализация, анти-ангиогенная терапия, моноклональные антитела

Использование антител против антигенных маркеров злокачественных клеток для диагностики и терапии солидных опухолей недостаточно эффективно. Лишь 0.01–0.001% введенной дозы антител оказывается связанной с тканью солидной опухоли, так как выход макромолекул за пределы сосудистого русла и их рас-

пределение в опухоли ограничены несколькими факторами. Во-первых, плотная упаковка клеток в эпителиальных опухолях и наличие фиброзной стромы представляют мощный физический барьер, ограничивающий перемещение макромолекул. Во-вторых, отсутствие эффективного лимфатического дренажа в большинстве опухолей приводит к повышенному интерстициальному давлению, которое препятствует притоку макромолекул в ткань опухоли. В-третьих, многочисленные молекулы антител, которые выходят за пределы сосудистого русла, адсорбируются на мембранах прилежащих к сосуду клеток и не проникают в толщу ткани [13].

Преодолеть эти ограничения позволяет подход, основанный на использовании антител, распознающих не сами злокачественные клетки, а элементы сосудистой сети опухолей. Рост и метастазирование большинства солидных неоплазий критически зависят от формирования новых кровеносных сосудов. Без активного ангиогенеза рост опухолей диаметром более нескольких миллиметров невозможен [5]. В течение последних лет опубликованы данные, указывающие на высокую эффективность методов лучевой диагностики, иммуно-ПЭТ и иммуно-ОФЭКТ (однотонной эмиссионной компьютерной томографии), основанных на применении моноклональных антител (МКАТ) против антигенов сосудистого эндотелия. Указанные методы позволяют локализовать очаги роста опухолей и оценить их распространенность и размеры. К числу препаратов такого рода относят меченные изотопами МКАТ против фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) или его рецептора (VEGF-R) [3, 14].

Перспективным маркером сосудистого эндотелия опухолей является эндоглин (CD105), специфический мембранный гликопротеин, участвующий в регуляции размножения, дифференцировки и миграции клеток эндотелия [2]. Преимущества эндоглина обусловлены тем, что он экспрессирован более всего на мембранах клеток эндотелия растущих сосудов опухолей. Эндоглин локализован на поверхности клеток, об-

ращенной в просвет сосуда, и потому наиболее доступен для распознавания антителами. Плотность эндоглина на мембране достигает 3 млн копий на клетку, что на порядок выше, чем экспрессия рецепторов VEGF [7, 12]. Присутствие его характерно также для нормальных клеток (макрофагов, перидитов), участвующих в формировании стромы опухолей. Наряду с высокой экспрессией на сосудистой эндотелии эндоглин обнаружен на клетках некоторых опухолей, таких как саркомы и меланомы [8].

Молекулы эндоглина на мембранах нормальных и злокачественных клеток подвергаются протеолитическому расщеплению с участием металлопротеазы MMP-14 [4]. В результате образуются молекулы растворимой формы эндоглина, которые присутствуют в циркуляции.

В зарубежных лабораториях (США, Канада, Китай) в настоящее время проводится изучение диагностических и терапевтических возможностей препарата TRC-105, который представляет собой химерную молекулу, состоящую из антиген-распознающей части мышинового МКАТ против эндоглина человека и константной части (Fc-фрагмент) молекулы иммуноглобулина G1 (IgG1) человека [6, 10]. По замыслу создателей, присутствие Fc-фрагмента должно уменьшить иммуногенность препарата и позволить многократное введение его пациентам без развития сопутствующего иммунного ответа на фрагмент мышинового белка [9].

Опыт применения меченных изотопами МКАТ в доклинических исследованиях и клинических испытаниях показал, что введенные в организм меченные изотопами целостные молекулы антител относительно равномерно распределяются в сосудистом русле и создают высокий уровень фонового сигнала, препятствующего выявлению очага преимущественного накопления метки. Снижение фонового сигнала происходит в течение 2–3 суток, что сравнимо со сроками распада ряда короткоживущих радиоактивных меток. Кроме того, это вынуждает разделять во времени процедуры введения изотопной метки и регистрации ее распределения в организме. Длительная циркуляция меченых антител в организме обусловлена связыванием Fc-области молекул антител с Fc-рецепторами, присутствующими на мембранах клеток эндотелия и на циркулирующих клетках крови.

Для устранения этого недостатка вместо целостных молекул антител используют их антиген-распознающие фрагменты (Fab-фрагменты), которые по молекулярной массе втрое меньше целостных молекул и лишены Fc-области, определяющей длительное существование молекул в циркуляции [15].

В лаборатории гибридной технологии РНЦ РХТ им. академика А. М. Гранова создана первая в стране уникальная панель из 12-ти МКАТ против эндоглина человека [1]. Доказательства специфичности созданных МКАТ получены при изучении их взаимодействия с референс-препаратами антигенов и антител. При иммунохимическом анализе были выявлены МКАТ, связывающие топографически удаленные и структурно различные антигенные детерминанты эндоглина. На их основе был разработан двухдетерминантный метод иммуноферментного анализа, который позволяет определять концентрацию растворимого эндоглина [11]. Испытания разработанного метода показали, что по чувствительности он превосходит известные импортные аналоги и поэтому позволяет определять концентрацию растворимого эндоглина в циркулирующей крови, в моче и в ликворе без предварительного концентрирования образцов. Количественная оценка растворимого эндоглина важна для расчета эффективной дозы антител, вводимых в организм, поскольку находящиеся в циркуляции свободные молекулы эндоглина могут служить перехватчиками антител. Кроме того, определение концентрации растворимого эндоглина может быть полезно для оценки масштабов дисфункции сосудистого эндотелия, которая возникает при патологии беременности, прогрессирующем росте новообразований и при атеросклеротическом поражении сосудистой стенки.

Среди созданных МКАТ имеются реагенты, которые выявляют эндоглин на мембранах живых клеток, что позволяет выделять и исследовать соответствующие клеточные популяции. В опытах с культивируемыми клетками эндотелия было показано, что МКАТ, связавшиеся с рецептором CD105, остаются на поверхности клеток в течение нескольких часов. Одновременно происходит погружение комплексов «рецептор-МКАТ» в цитоплазму клеток и их перемещение в составе эндосом в перинуклеарное пространство, где они сохраняются более 48 часов (рис. 1). Таким образом, на основе полученных МКАТ могут быть разработаны реагенты, обеспечивающие адресную доставку изотопных меток как на мембрану клеток эндотелия, так и в их цитоплазму. Кроме того, способность полученных МКАТ формировать на поверхности клеток эндотелия интернализуемые иммунные комплексы указывает на возможность создания на основе этих реагентов иммунотоксичных, способных избирательно повреждать кровеносные сосуды, питающие очаги злокачественного роста.

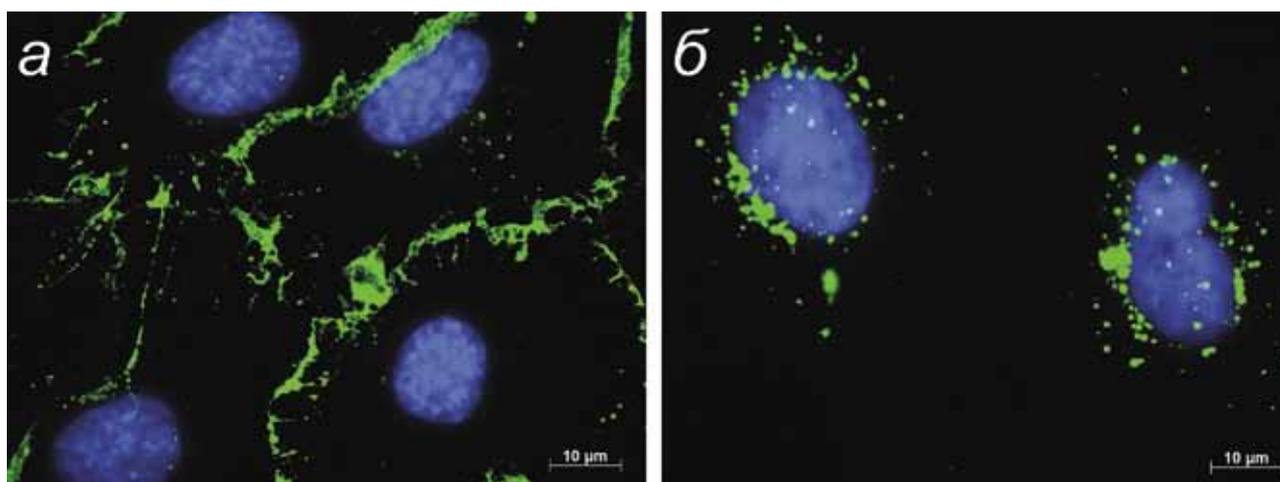


Рис.1. Взаимодействие моноклональных антител к эндоглину с клетками эндотелия. Клетки эндотелия линии EA.hy926 через 30 мин после добавления в культуру меченных флуоресцеином МКАТ против эндоглина (а) и через 24 часа после удаления из среды меченых МКАТ (б). Ядра окрашены DAPI. Зеленое свечение — комплекс «эндоглин-МКАТ». Сразу после удаления антител (а) эндоглин выявляется на поверхностной мембране клеток, (б) спустя 24 часа заключенные в эндосомах комплексы эндоглина с МКАТ локализованы в перинуклеарном пространстве клеток.

ЛИТЕРАТУРА

- Смирнов И.В., Грязева И.В., Самойлович М.П. и др. Панель моноклональных антител против эндоглина человека: получение и характеристика // Цитология. — 2015. — Т. 57. — № 7. — С. 499-508.
- Смирнов И.В., Грязева И.В., Самойлович М.П., Климович В.Б. Эндоглин (CD105) — мишень визуализации и анти-ангиогенной терапии злокачественных опухолей // Вопросы онкологии. — 2015. — Т. 61. — № 6. — С. 898-907.
- Ellis L.M., Hicklin D.J. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity // Nat. Rev. Cancer. — 2008. — Vol. 8. — № 8. — P. 579-591.
- Hawinkels L.J., Kuiper P., Wiercinska E. et al. Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis // Cancer Res. — 2010. — Vol. 70. — P. 4141-4150.
- Kerbel R.S. Tumor angiogenesis // N. Engl. J. Med. — 2008. — Vol. 358. — P. 2039-2049.
- Ollauri I, Lopez-Novoa J.M., Pericacho M. Endoglin-based biological therapy in the treatment of angiogenesis-dependent pathologies // Expert Opin. Biol. Ther. — 2017. — Vol. 17. — № 9. — P. 1053-1063.
- Paauwe M., ten Dijke P., Hawinkels L.J. Endoglin for tumor imaging and targeted cancer therapy // Expert Opin. Ther. Targets. — 2013. — Vol. 4. — P. 421-435.
- Pardali E., van der Schaff D.W., Wiercinska E. et al. Critical role of endoglin in tumor cell plasticity of Ewing sarcoma and melanoma // Oncogene. — 2011. — Vol. 30. — P. 334-345.
- Rosen L.S., Hurwitz H.I., Wong M.K. et al. A phase I first-in-human study of TRC105 (Anti-Endoglin Antibody) in patients with advanced cancer // Clin. Cancer Res. — 2012. — Vol. 18. — P. 4820-4829.
- Shiozaki K., Harada N., Greco W.R. et al. Antiangiogenic chimeric anti-endoglin (CD105) antibody: pharmacokinetics and immunogenicity in nonhuman primates and effects of doxorubicin // Cancer Immunol. Immunother. — 2006. — Vol. 55. — P. 140-150.
- Смирнов И.В., Грязева И.В., Самойлович М.П. et al. Different pairs of monoclonal antibodies detect variable amounts of soluble endoglin in human blood plasma // Immunochem. Immunopathol. — 2016. — Vol. 2. — P. 121.
- Takahashi N., Haba A., Matsuno F., Seon B.K. Antiangiogenic therapy of established tumors in human skin/severe combined immunodeficiency mouse chimeras by anti-endoglin (CD105) monoclonal antibodies, and synergy between anti-endoglin antibody and cyclophosphamide // Cancer Res. — 2001. — Vol. 61. — P. 7846-7854.
- Thorpe P.E. Vascular targeting agents as cancer therapeutics // Clin. Cancer Res. — 2004. — Vol. 15. — P. 415-427.
- Welti J., Loges S., Dimmeler S., Carmeliet P. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer // J. Clin. Invest. — 2013. — Vol. 123. — № 8. — P. 3190-3200.
- Zhang Y., Hong H., Orbay H. et al. PET imaging of CD105/endoglin expression with $^{61/64}\text{Cu}$ -labeled Fab antibody fragment // Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. — 2013. — Vol. 40. — P. 759-767.

V.B. Klimovich¹, A.A. Pinevich^{1,2}, I.V. Smirnov¹, I.Yu. Krutetskaya¹, I.V. Gryazeva¹, O.A. Shashkova¹, L.A. Terechina¹, A.Yu. Stolbovaya¹, N.L. Vartanyan¹, M.P. Samoilovich^{1,2}

Perspectives of application of antibodies against endoglin (CD105) for visualization and anti-angiogenic therapy of tumors

¹ A.M. Granov Russian Scientific Center for Radiology and Surgical Technologies

² St. Petersburg State University
St. Petersburg

During last years monoclonal antibodies (MAB) directed against vascular endothelium markers demonstrated their efficiency for visualization and targeted delivery of therapeutic drugs to tumors. Endoglin (CD105) which serves as a key element that determines endothelial cells quiescence or activation is one of such markers. Endoglin is highly expressed on the

vascular endothelium of growing tumors. A first panel of MAB against endoglin in our country was produced at the hybridoma technology laboratory of RRC RST named after A.M. Granov. On the basis of these MAB ELISA was created allowing detection of endoglin in human plasma and other biological fluids. Several MAB had been shown to bind endoglin on the membrane of the cultured endothelial cells and to persist there for several hours. During the first 30 min after binding some of the immune complexes "endoglin-MAB" were internalized into the cytoplasm and were found included in the endosomes. In future these MAB can be used to create the reagents for the addressed delivery of isotope tags both on the membrane and into the cytoplasm of endothelial cells.

Key words: endoglin, CD105, tumors, endothelium, internalization, visualization, anti-angiogenic therapy, monoclonal antibodies