

14

Термодинамический анализ стабильности структуры однодоменного терапевтического антитела

© И.Е. Елисеев¹, А.Н. Юденко¹, Н.А. Беседина¹, А.Б. Улитин²,
В.М. Екимова², С.Р. Евдокимов², Ю.В. Путинцева²,
П.А. Яковлев², М.И. Ломовская², И.Н. Тертеров¹,
А.А. Богданов¹, М.В. Дубина³

¹ Санкт-Петербургский национальный исследовательский академический университет РАН,

² ЗАО „Биокад“, Санкт-Петербург

³ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

E-mail: eliseev@spbau.ru

Поступило в Редакцию 1 сентября 2017 г.

Стабильность нового однодоменного терапевтического антитела к рецептору ErbB3 исследована методом спектроскопии флуоресценции при различных концентрациях денатурирующего вещества и температуре. Анализ экспериментальных кривых денатурации позволил построить полную термодинамическую модель процесса денатурации и определить все параметры перехода: $\Delta G = 8.5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, $T_m = 76^\circ\text{C}$, $\Delta H_m = 107 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta C_p = 1.8 \text{ kcal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$. Полученные данные свидетельствуют о высокой стабильности антитела в широком диапазоне условий, что чрезвычайно важно для дальнейших структурно-функциональных исследований и возможного терапевтического применения.

DOI: 10.21883/PJTF.2017.23.45280.17022

Важными мишенями при терапии онкологических заболеваний являются рецепторные тирозинкиназы ErbB1-4 [1]. Моноклональные антитела, блокирующие рецепторы ErbB1 и ErbB2, успешно используются в терапии уже два десятка лет. Однако в последнее время появились экспериментальные свидетельства того, что третий член семейства, рецептор ErbB3, ответственен за развитие резистентности при терапии ингибиторами ErbB1-2 [2]. Вследствие этого существует необходимость разработки новых терапевтических антител к рецептору ErbB3, которые

позволят преодолеть проблему резистентности за счет одновременного блокирования ErbB1/2 и ErbB3.

В настоящее время уже более десятка антител к ErbB3 находятся на разных стадиях клинических испытаний [3]. В России разработкой антител к ErbB3 занимается компания „Биокад“, при этом используются особые неканонические одноцепочечные тела, встречающиеся у представителей семейства верблюдовых (*Camelidae*) [4]. Преимуществами таких одноцепочечных антител являются высокая аффинность, повышенная стабильность и простота биотехнологического производства. Путем иммунизации лам и последующего отбора при помощи фагового дисплея компанией „Биокад“ был получен ряд одноцепочечных антител к ErbB3.

Стабильность структуры является важнейшей характеристикой белкового терапевтического препарата. Термическая стабильность и стабильность к химической денатурации тесно связаны с агрегационной способностью и адсорбцией на различных поверхностях и критически важны при получении, очистке и хранении препарата, а также его терапевтическом применении [5]. В настоящей работе нами проведен полный термодинамический анализ варибельного фрагмента одноцепочечного антитела (VNH-1) к III внеклеточному домену рецептора ErbB3, ранее отобранного в компании „Биокад“ для дальнейшей разработки.

С физической точки зрения термодинамика денатурации глобулярного белка может быть описана моделью двух состояний

$$F \xrightleftharpoons{\Delta G(T)} U, \quad F + U = 1, \quad U = F \exp\left(\frac{-\Delta G(T)}{RT}\right), \quad (1)$$

где F обозначает долю молекул белка в нативном состоянии, U — в денатурированном состоянии, $\Delta G(T)$ — свободная энергия денатурации. Используя уравнение Гиббса–Гельмгольца и соотношение $\Delta H(T) = \int_{T_m}^T \Delta C_p dT = \Delta H_m + \Delta C_p(T - T_m)$, можно получить следующее уравнение для зависимости свободной энергии от температуры:

$$\Delta G(T) = \Delta H_m \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) + \Delta C_p \left(T - T_m - T \ln \frac{T}{T_m}\right), \quad (2)$$

параметрами перехода являются температура плавления T_m ($\Delta G(T_m) = 0$), энтальпия перехода ΔH_m и изменение теплоемкости ΔC_p , которое считается не зависящим от температуры.

При нормальных условиях равновесие (1) сильно смещено в сторону нативного состояния и доля денатурированного белка чрезвычайно мала, что затрудняет определение свободной энергии. Классическим биохимическим приемом для того, чтобы сместить равновесие и сделать возможным количественный анализ перехода, является добавление денатурирующего вещества, например мочевины [6]. Для глобулярных белков свободная энергия денатурации линейно зависит от концентрации мочевины [7]

$$\Delta G(T, [Urea]) = m([Urea]_{1/2}(T) - [Urea]), \quad (3)$$

где m — коэффициент зависимости от концентрации мочевины, $[Urea]$ — концентрация мочевины, $[Urea]_{1/2}(T)$ — концентрация мочевины в середине кривой денатурации при данной температуре. Дальнейшая экстраполяция к нулевой концентрации денатурирующего вещества позволяет получить искомое значение $\Delta G(T)$.

Для проведения термодинамического анализа нами был получен и очищен рекомбинантный переменный фрагмент одноцепочечного антитела к EгВ3, аминокислотная последовательность которого указана в таблице. Вкратце, генетическая конструкция на основе вектора рЕТ22b (Novagen), кодирующая антитело с С-концевым гистидиновым тагом, была использована для трансформации клеток *E. coli* BL21(DE3). Белок был очищен при помощи аффинной хроматографии на Ni-NTA и ионообменной хроматографии на колонке MonoQ по стандартным протоколам, чистота белка составила не менее 95% по данным электрофореза в полиакриламидном геле (данные не приведены). Затем была приготовлена серия растворов белка (0.07 mg/ml) в 50 mM Na₂HPO₄ (pH = 8.0) с различными концентрациями мочевины от 0 до 10 М с шагом 0.25 М.

Для определения доли денатурированного белка нами проводились измерения флуоресценции аминокислотных остатков триптофана в исследуемом антителе в диапазоне 300–500 nm при возбуждении светом с длиной волны 280 nm на спектрометре Chirascan (Applied Photophysics). Спектр триптофановой флуоресценции чувствителен к структурным изменениям в белке и сдвигается в длинноволновую область, меняет форму и интенсивность при денатурации (рис. 1), что было использовано для расчета долей нативного и денатурированного антитела. Для каждого спектра флуоресценции нами был рассчитан

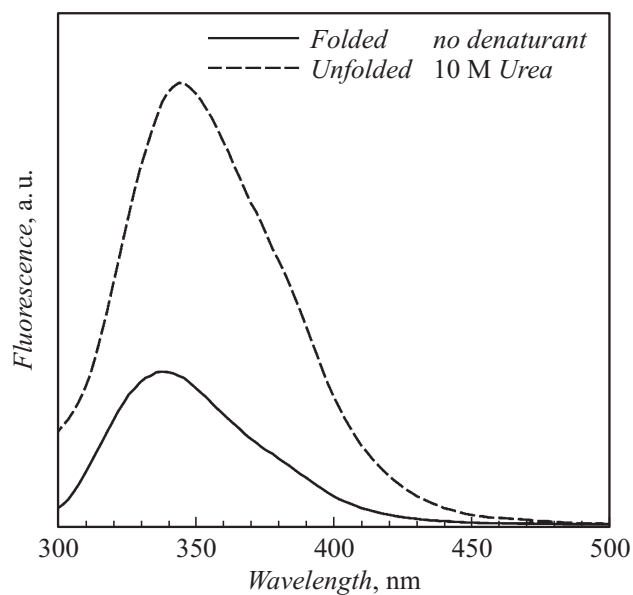


Рис. 1. Спектры флуоресценции однодоменного антитела VNH-1 в нативном и полностью денатурированном состоянии ($T = 20^\circ\text{C}$). Посредством анализа спектров флуоресценции в зависимости от концентрации мочевины были определены доли нативного и денатурированного белка и построены кривые денатурации для различных температур.

коэффициент асимметрии S распределения интенсивности. Затем кривая денатурации белка была построена как зависимость S от концентрации мочевины. Для определения коэффициента m и величины $[Urea]_{1/2}$ кривая денатурации была аппроксимирована следующей функцией:

$$S = \frac{S_F + S_U \exp\left(\frac{-m([Urea]_{1/2} - [Urea])}{RT}\right)}{1 + \exp\left(\frac{-m([Urea]_{1/2} - [Urea])}{RT}\right)}, \quad (4)$$

где S_F и S_U — величины S для нативного и денатурированного состояний, $S = FS_F + US_U$, аппроксимация проводилась нелинейным

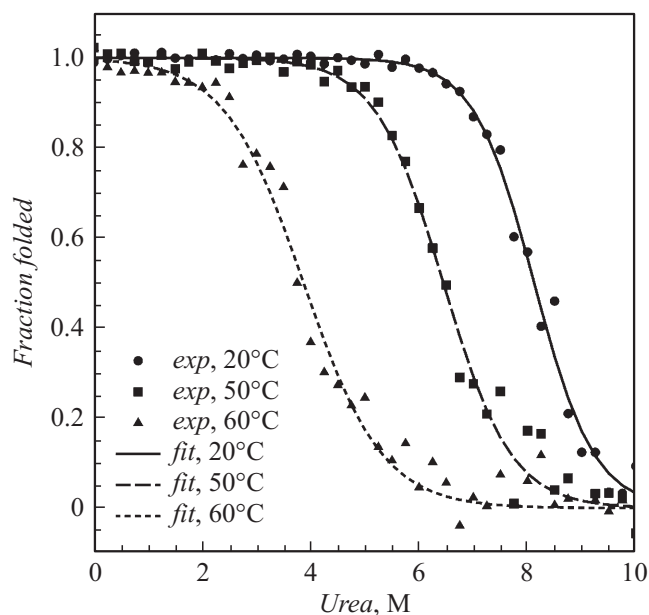


Рис. 2. Кривые денатурации однодоменного антитела VNH-1 мочевиной для нескольких температур. Аппроксимация кривых уравнением (4) позволила определить коэффициент m , параметр $[Urea]_{1/2}$ и получить ΔG для каждой температуры.

методом наименьших квадратов. Таким образом были измерены спектры флуоресценции и проведен анализ для всей серии образцов с различными концентрациями мочевины в температурном диапазоне 10–65°C. Экспериментальные данные и аппроксимации функцией (4) для нескольких температур приведены на рис. 2.

После получения экспериментальных значений $\Delta G(T)$ из кривых денатурации для разных температур мы воспользовались уравнением Гиббса–Гельмгольца (2) для определения параметров ΔH_m , ΔC_p и T_m (рис. 3); найденные величины приведены в таблице. Как видно из рис. 3, экспериментальные данные хорошо описываются уравнением (2), которое позволяет предсказывать стабильность антитела в широких диапазонах температур и условий среды. Полученные вели-

Значения термодинамических величин, полученные в результате анализа кривых денатурации и температурной зависимости свободной энергии денатурации

Белок	Аминокислотная последовательность	$\langle m \rangle$, $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$	$[Urea]_{1/2}$, М (20°C)	ΔG , $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ (20°C)	ΔH_m , $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$	ΔC_p , $\text{kcal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$	T_m , °C
VHH-1-His ₆	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLS CAASGRITSSKYAMGWFRQAP GKGTEFVATISWSDGSTYYAD SVEGRFTISRDNKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAAADVLA GTFEYDYWGQGLTVVSSH HHHHH	1.04 ± 0.09	8.12 ± 0.05	8.5 ± 0.6	107 ± 9	1.8 ± 0.5	76 ± 2 75 ± 1 (DSC)

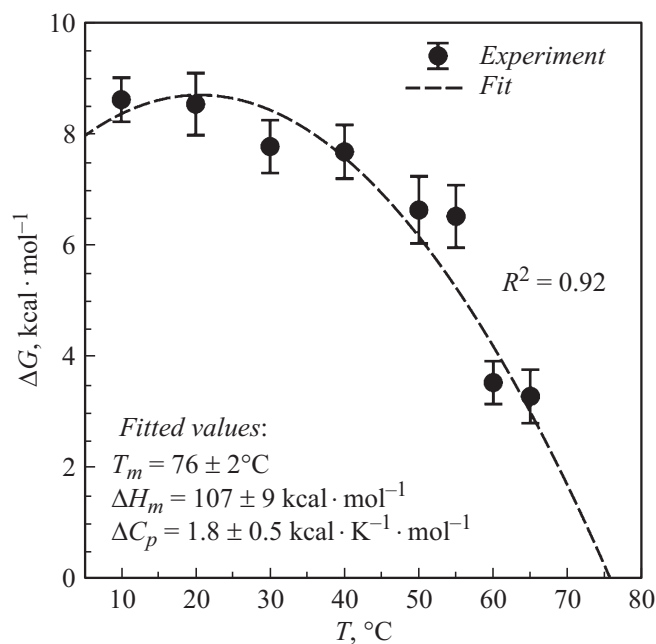


Рис. 3. Экспериментальная зависимость свободной энергии денатурации от температуры и ее аппроксимация уравнением Гиббса–Гельмгольца (2). В результате аппроксимации получены термодинамические параметры перехода ΔH_m , ΔC_p и T_m .

чины $\Delta G = 8.5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ (20°C) и $T_m = 76^\circ\text{C}$ свидетельствуют о чрезвычайно высокой стабильности исследуемого антитела (в сравнении со средними значениями для белков подобного размера у различных живых организмов [8]).

Для проверки предсказаний модели нами было проведено независимое измерение температуры плавления антитела методом дифференциальной сканирующей калориметрии на приборе nanoDSC (TA Instruments). Значение температуры плавления $T_m^{\text{DSC}} = 75 \pm 1^\circ\text{C}$ было получено по положению пика теплоемкости (график не приведен) и замечательно согласуется со значением, установленным на основе спектрометрических экспериментов. Как видно из уравнения (2) и

рис. 3, свободная энергия денатурации является выпуклой функцией температуры и существует два значения температуры, при которых свободная энергия денатурации равна нулю. Холодовая денатурация, когда структура нарушается не при нагревании, что вполне ожидаемо, а при охлаждении, является общей закономерностью для глобулярных белков [9]. В данном случае температура перехода, полученная решением уравнения (2) с найденными параметрами, равна -30°C . Таким образом, исследуемый белок также стабилен при охлаждении в широкой области температур, типичных для биохимических экспериментов.

В заключение отметим, что в настоящей работе нами была исследована стабильность нового однодоменного антитела к рецептору ErbB3. Анализ кривых денатурации позволил найти зависимость свободной энергии денатурации от температуры и определить все термодинамические параметры перехода: энтальпию плавления, изменение теплоемкости, температуру плавления, а также предсказать температуру холодовой денатурации. Полученные данные свидетельствуют о высокой термодинамической стабильности белка в широком диапазоне условий, что чрезвычайно важно для дальнейших структурных и функциональных исследований, а в перспективе и для возможного терапевтического применения.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (уникальный идентификатор RFMEFI57716X0217, соглашение № 14.577.21.0217).

Список литературы

- [1] Поляновский О.Л., Лебедеко Е.Н., Деев С.М. // Биохимия. 2012. Т. 77. В. 3. С. 289–311.
- [2] Kol A., van Scheltinga A.G.T., Timmer-Bosscha H., Lamberts L.E., Bensch F., de Vries E.G.E., Schröder C.P. // Pharmacol. Ther. 2014. V. 143. P 1–11.
- [3] Zhang N., Chang Y., Rios A., An Z. // Acta Biochim. Biophys. Sinica. 2015. V. 48. P. 39–48.
- [4] Hamers-Casterman C.T.S.G., Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G., Hammers C., Songa E.B., Bendahman N., Hammers R. // Nature. 1993. V. 363. P. 446–448.

-
- [5] *Manning M.C., Chou D.K., Murphy B.M., Payne R.W., Katayama D.S.* // *Pharm. Res.* 2010. V. 27. P. 544–575.
- [6] *Shaw K.L., Scholtz J.M., Pace C.N., Grimsley R.G.* // *Protein structure, stability, and interactions* / Ed. J. Shriver. *Methods in molecular biology*. V. 490. Humana Press, 2009. P. 41–55.
- [7] *Myers J.K., Pace C.N., Scholtz J.M.* // *Protein Sci.* 1995. V. 4. P. 2138–2148.
- [8] *Ghosh K., Dill K.* // *Biophys. J.* 2010. V. 99. P. 3996–4002.
- [9] *Privalov P.L.* // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1990. V. 25. P. 281–306.