

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГЕПАРИНА НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АНТИГЕН-АНТИТЕЛО В МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО АНТИТЕЛА БЕВАЦИЗУМАБ И ЕГО МИШЕНИ VEGF-A165

М.П. Шевелёва*, Е.Л. Немашкалова, Е.И. Дерюшева

*Институт биологического приборостроения
ФГБУН ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушкино, просп. Науки, 3*

В данной работе проведено исследование влияния гепарина на процесс связывания VEGF-A165 — наиболее распространенного и важного из факторов роста — и моноклонального антитела бевацизумаб методом биослойной интерферометрии. Смоделирован комплекс полноразмерного антитела бевацизумаб с VEGF-A165. Полученные данные можно использовать при терапии с использованием данного антитела, а также в разработке других терапевтических антител с максимальной специфичностью к мишеням в различных условиях.

Ключевые слова: фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), бевацизумаб, гепарин

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 22-24-00083.

Для цитирования: Шевелёва М.П., Немашкалова Е.Л., Дерюшева Е.И. Изучение влияния гепарина на взаимодействие антиген-антитело в модельной системе терапевтического антитела бевацизумаб и его мишени VEGF-A165. *Биомедицина*. 2023;19(3E):77–80. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-77-80>

Поступила 20.04.2023

Принята после доработки 15.05.2023

Опубликована 06.11.2023

EFFECT OF HEPARIN ON ANTIGEN – ANTIBODY INTERACTION IN A MODEL SYSTEM OF THE BEVACIZUMAB THERAPEUTIC ANTIBODY AND ITS TARGET VEGF-A165

Marina P. Shevel'yova*, Ekaterina L. Nemashkalova, Evgeniya I. Deryusheva

*Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research
of the Russian Academy of Sciences
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Nauki Ave., 3*

In this work, we studied the effect of heparin on the binding process of VEGF-A165, the most common and important growth factor, and the monoclonal antibody bevacizumab by bio-layer interferometry. A complex of the full-length bevacizumab antibody with VEGF-A165 was modeled. The data obtained can be used in therapy with this antibody, as well as in the development of other therapeutic antibodies with maximum target specificity under various conditions.

Keywords: vascular endothelial growth factor (VEGF), bevacizumab, heparin

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Funding: research was funded by a grant from the Russian Science Foundation No. 22-24-00083.

For citation: Shevelyova M.P., Nemashkalova E.L., Deryusheva E.I. Effect of Heparin on Antigen-Antibody Interaction in a Model System of the Bevacizumab Therapeutic Antibody And its Target VEGF-A165. *Journal Biomed.* 2023;19(3E):77–80. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-77-80>

Submitted 20.04.2023

Revised 15.05.2023

Published 06.11.2023

Наиболее эффективные таргетные препараты, занимающие основной финансовый объем фармацевтического рынка, представляют собой моноклональные антитела, отобранные из комбинаторных библиотек по принципу их наивысшего сродства к мишени. Исследование взаимодействия антитела и антигена проводится в условиях раствора, далёких от условий кровотока: в стандартных буферах отсутствуют сывороточный альбумин, иммуноглобулины, липопротеины, а также различные низкомолекулярные соединения и ионы, концентрация которых может варьировать в физиологических пределах или существенно изменяться при некоторых патологиях. Мажорные компоненты крови, а также низкомолекулярные агенты способны влиять на взаимодействие антиген-антитело за счет эффекта молекулярного краудинга или низкоспецифических взаимодействий с антигеном и антителом. Поиск способов сохранения функциональных свойств этих препаратов, которые при сохранении аффинности позволили бы снизить побочные эффекты и вводимую дозу при увеличении сроков хранения, является актуальной задачей медицинской биотехнологии, которая, в свою очередь, тесно связана с задачей изучения влияния различных добавок на взаимодействие антиген-антитело.

В данной работе было проведено изучение влияния гепарина на взаимодействие антиген-антитело в модельной системе терапевтического антитела бевацизумаб и его мишени VEGF-A165.

VEGF — это сигнальный белок, играющий наиболее важную роль в организме человека среди других факторов

роста [2]. Он вырабатывается клетками для стимулирования роста новых сосудов [4]. Актуальность исследования свойств VEGF обусловлена также его прогностической важностью при развитии различных заболеваний, а также эффективностью антиангиогенной терапии при лечении некоторых видов рака, тромбоза, ретинопатии и макулодистрофии и перспективностью применения терапевтических индукторов ангиогенеза [1]. Рецепторы к данному фактору присутствуют как на эндотелиальных, так и на других типах клеток, чем обусловлены множественные эффекты VEGF. VEGF-A относится к белкам с большой долей внутренней неупорядоченности, и на сегодня отсутствует кристаллическая структура полноразмерного белка, а существующие работы посвящены исследованию его отдельных частей. Недавно нами была предложена модель полноразмерного VEGF-A165, при этом линейные размеры модели и содержание элементов вторичной структуры соответствовали экспериментальным данным, полученным методами кругового дихроизма и динамического рассеяния света [8].

Бевацизумаб (DrugBank Accession Number, DB00112) представляет собой рекомбинантное гуманизированное моноклональное антитело, которое избирательно связывается и нейтрализует биологическую активность человеческого VEGF-A165 [5]. Для эффективной передачи сигнала VEGF требуется связывание с корецепторами, нейропилином и гепарином (HE). HE представляет собой кислый серосодержащий гликозаминогликан. В клинической практике он применяется как антикоагулянт

прямого действия [9]. Концентрация HE в плазме у клинически здоровых лиц составляет 1–2,4 мг×л-1 [3]. Связывание HE с VEGF-A165 модулирует связанный с ангиогенезом каскад [6, 7]. Ранее нами было показано, что HE не влияет на вторичную структуру VEGF-A165, но увеличивает площадь его гидрофобной поверхности и способствует его агрегации [8].

Полноразмерная разрешенная структура бевацизумаба и его комплекса с VEGF на сегодня отсутствует. Это делает практически невозможным прогнозирование необходимых изменений, ведущих к увеличению сродства антител к антигену, исходя из вклада отдельных аминокислот в поддержание стабильности структуры антитела. Также трудно оценить влияние лигандов различной природы, являющихся неотъемлемой частью реальных систем.

Кинетические и равновесную константы взаимодействия VEGF-A165 и бевацизумаба в присутствии HE определяли методом биослойной интерферометрии с использованием OCTET QKE System. В данной работе VEGF-A165 (0,5 мкМ) иммобилизовали химически через аминокислоты на поверхности биосенсора. Концентрация бевацизумаба в экспериментах составила 15 и 20 нМ. В качестве целевой добавки использовался гепарин в концентрациях 32–224 нМ. Расчет констант взаимодействия лиганда (VEGF-A165) с аналитом (бевацизумаб) проводили с использованием схемы бивалентного аналита и стандартной программы Octet Data Analysis. Равновесная константа диссоциации комплекса бевацизумаб–VEGF-A165 $0,15 \pm 0,43$ нМ совпадает с литературными данными [10], при этом добавление гепарина в концентрации 32 нМ не влияло на равновесную константу диссоциации комплекса. Добавление 224 нМ гепарина увеличило её в 38 раз: $5,7 \pm 1,1$ нМ. В присутствии такой концентрации гепарина константа скорости ассоциации умень-

шилась в 15,8 раза, а константа скорости диссоциации увеличилась в 2,4 раза.

Для проведения *in silico* анализа взаимодействий антиген-бевацизумаб, а также установления возможного механизма влияния гепарина на комплекс антиген-антитело были смоделированы модели полноразмерного антитела и его комплекса с VEGF-A165. Моделирование проводилось на основе доступной кристаллической структуры фрагмента бевацизумаба (мутантная форма), представленной в PDB банке (PDB код 6BFT) и предсказанными серверами AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) и I-Tasser (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) тяжелой и легкой цепей бевацизумаба. Линейные размеры модели соответствовали экспериментальным данным, полученным методом динамического рассеяния света (гидродинамический радиус $RH=6,4$ нм). Для моделирования комплекса VEGF-A165–бевацизумаб использовался сервер ClusPro (<https://cluspro.bu.edu/login.php>). С помощью специализированного скрипта для PyMol для полученного комплекса были найдены остатки, входящие в сайт взаимодействия, которые относятся как к рецептор-связывающему, так и гепарин-связывающему домену VEGF. Более того, предполагаемый сайт связывания HE–VEGF-A165 [8] имеет общие аминокислоты с сайтами связывания бевацизумаба и рецепторов, что может объяснить влияние HE на взаимодействие VEGF-A165 с антителом.

Таким образом, были получены данные о степени влияния гепарина на взаимодействие бевацизумаба с VEGF-A165, а также смоделирован комплекс полноразмерного антитела с VEGF-A165. Полученные результаты могут учитываться при терапии с использованием данного антитела, а также при разработке других терапевтических антител с максимальной специфичностью к мишеням в различных условиях и функциональной стабильностью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Adamis A.P., Shima D.T. The role of vascular endothelial growth factor in ocular health and disease. *Retina*. 2005;25:111–118. DOI: 10.1097/00006982-200502000-00001.
2. Apte R.S., Chen D.S., Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*. 2019;176:1248–1264. DOI: 10.1016/j.cell.2019.01.021.
3. Engelberg H. Plasma heparin levels in normal man. *Circulation*. 1961;23:578–581. DOI: 10.1161/01.cir.23.4.578.
4. Ferrara N. VEGF-A: A critical regulator of blood vessel growth. *Eur. Cytokine Netw*. 2009;20:158–163. DOI: 10.1684/ecn.2009.0170.
5. Garcia J., Hurwitz H.I., Sandler A.B., Miles D., Coleman R.L., Deurloo R., Chinot O.L. Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook. *Cancer Treat. Rev*. 2020;86:102017. DOI: 10.1016/j.ctrv.2020.102017.
6. Gitay-Goren H., Soker S., Vlodavsky I., Neufeld G. The binding of vascular endothelial growth factor to its receptors is dependent on cell surface-associated heparin-like molecules. *J. Biol. Chem*. 1992;267:6093–6098. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)42666-X.
7. Keyt B.A., Berleau L.T., Nguyen H.V., Chen H., Heinsohn H., Vandlen R., Ferrara N. The carboxyl-terminal domain (111–165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J. Biol. Chem*. 1996;271:7788–7795. DOI: 10.1074/jbc.271.13.7788.
8. Nemashkalova E.L., Shevelyova M.P., Machulin A.V., Lykoshin D.D., Esipov R.S., Deryusheva E.I. Heparin-Induced Changes of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF165) Structure. *Biomolecules*. 2023;13(1):98. DOI: 10.3390/biom13010098.
9. Onishi A., Ange K.St., Dordick J.S., Linhardt R.J. Heparin and anticoagulation. *Front. Biosci.* (Landmark Ed.) 2016;21(7):1372–1392. DOI: 10.2741/4462.
10. Papadopoulos N., Martin J., Ruan Q., et al. Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis*. 2012;15:171–185. DOI: 10.1007/s10456-011-9249-6.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Шевелёва Марина Петровна*, к.х.н., Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН;
e-mail: marina.shevelyova@gmail.com

Немашкалова Екатерина Леонидовна, к.б.н., Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН;
e-mail: elnemashkalova@gmail.com

Дерюшева Евгения Игоревна, к.ф.-м.н., Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН;
e-mail: evgenia.deryusheva@gmail.com

Marina P. Shevelyova*, Cand. Sci. (Chem.), Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: marina.shevelyova@gmail.com

Ekaterina L. Nemashkalova, Cand. Sci. (Biol.), Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: elnemashkalova@gmail.com

Evgeniya I. Deryusheva, Cand. Sci. (Phis.-Math.), Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: evgenia.deryusheva@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author