

УДК 612.017.1:616-097

## КОНФОРМАЦИОННЫЙ ФИНГЕРПРИНТИНГ С ПОМОЩЬЮ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ (НА ПРИМЕРЕ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА – АПФ)

© 2017 г. С.М. Данилов<sup>a,b,c\*</sup>

<sup>a</sup>University of Illinois at Chicago, Chicago, USA

<sup>b</sup>University of Arizona Health Sciences, Tucson, USA

<sup>c</sup>Медицинский научно-образовательный центр

Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: danilov@uic.edu

Поступила в редакцию 07.05.2017 г.

Принята к печати 02.06.2017 г.

За прошедшие 30 лет в моей лаборатории было получено и охарактеризовано более 40 моноклональных антител (мАТ), направленных к структурным и конформационным эпитопам ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) человека, крысы, мыши и других видов. Эти моноклональные антитела с успехом применялись для количественного определения АПФ методами ELISA, проточной цитофлуориметрии, блотинга и иммуногистохимии. Во всех этих методах использовали то или иное, но всегда одно анти-тело. Однако постепенно стало понятно, что принципиально новую информацию о структуре и функционировании АПФ можно получить, если попытаться использовать **набор** моноклональных антител. Когда мы закончили эпитопное картирование всех моноклональных антител против конформационных эпитопов АПФ человека, стало ясно, что получен новый мощный инструмент для исследования АПФ. Во-первых, оказалось, что связывание некоторых моноклональных антител очень чувствительно к тонким изменениям конформации АПФ, вызванным локальной денатурацией или инактивацией, связыванием ингибиторов, антител, или при некоторых заболеваниях. Во-вторых, появилась возможность детектировать и локализовать мутации АПФ человека. И, наконец, была сформулирована концепция **конформационного фингерпринтинга АПФ** с помощью моноклональных антител, которая, в свою очередь, позволила доказать тканевую специфичность АПФ, имеющую, на наш взгляд, большие научные и диагностические перспективы. Первоначальной задачей проекта было получение антител против органоспецифического эндотелия, которые можно использовать для направленной доставки лекарств в разные органы. Удивительно, но скрупулезная работа по получению и характеристике моноклональных антител к многочисленным эпитопам АПФ привела не только к получению самых эффективных антител для направленной доставки лекарств и генов в эндотелий **легких**, но и к разработке концепции **конформационного фингерпринтинга АПФ** и, в свою очередь, дала теоретические предпосылки для получения антител, специфичных к АПФ из разных органов. Мы уверены, что данная концепция применима к любому гликопротеину, если есть набор антител на разные эпитопы этого белка.

**Ключевые слова:** ангиотензин I-превращающий фермент, моноклональные антитела, конформация, тканевая специфичность, направленный транспорт лекарств в легкие

**DOI:** 10.7868/S0026898417060155

### ВВЕДЕНИЕ

В 1975 году George Kohler и Cesar Milstein опубликовали в журнале *Nature* статью, ставшую впоследствии знаменитой, о получении бессмертных линий клеток (гибридом), вырабатывающих моноклональные антитела (мАт) определенной специфичности [1]. Этот метод, за который они в 1984 году получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине, стремительно изменил **диагностику**, практически полностью вытеснив поликлональные антитела при количественном определении всех белков и тысяч

других веществ с использованием 1) иммуноферментного анализа (ELISA); 2) блотинга (Western Blotting); 3) иммуногистохимических методов; 4) субпопуляций клеток крови (равно как и любых других клеток) с помощью проточной цитофлуориметрии.

В последние годы мАт начали кардинально изменять **терапию** (и, в первую очередь, терапию опухолей). В настоящее время более 80 мАт используют в терапии многих видов рака, аутоиммунных и других заболеваний. Ирония состоит в том, что прибыли фармацевтических компаний от продажи мАт исчисляются сейчас десятками миллиардов долларов, тогда

как в 1975 году патентный отдел знаменитой Лаборатории молекулярной биологии (Кембридж, Великобритания) отказал авторам в продвижении патента, посчитав его “коммерчески бесперспективным” [2].

В 1983 году в Институте экспериментальной кардиологии Кардиологического центра АМН СССР, где я тогда работал, директором Института **В.Н. Смирновым** была организована группа по получению мАт к различным белкам, которые представляли интерес для различных лабораторий нашего института и наших коллабораторов. За относительно короткий срок сотрудниками этой группы (руководимой **И. Трахтом**) совместно с заинтересованными пользователями были получены десятки мАт к различным белкам. Мою группу, которая занималась изучением эндотелиальных клеток (клеток, выстилающих кровеносные сосуды), заинтересовала теоретическая возможность получения мАт, способных распознавать эндотелий капилляров разных органов, которые различались и функционально, и морфологически [3]. Такие антитела, будь они получены, могли бы использоваться для **направленной доставки лекарств** в разные органы (один из подходов, активно разрабатываемых тогда в нашем Институте).

Для получения антител, узнающих органоспецифичный эндотелий, сначала мы (с **Е. Алликметс (Садовникова)**) в 1984 году разработали эффективный метод культивирования эндотелиальных клеток человека (используя набор ростовых факторов человека [4], а затем получили **чистую** культуру эндотелиальных клеток **капилляров** легких, печени и почек человека. Однако на это клонирование и верификацию ушло больше месяца, и в результате мы получили по одной 35 мм чашке Петри клеток каждого вида, чего, конечно, не могло хватить для иммунизации мышей и последующего скрининга гибридом.

Альтернативным подходом к получению органоспецифических антител могло стать получение антител к какому-нибудь поверхностному мембранному белку эндотелиальных клеток, структура которого различалась в разных органах человека. **И. Сахаров**, который в то время работал в нашем Институте, предложил на роль такого органоспецифического белка АПФ, хотя, если оценивать объективно, оснований для этого тогда практически не было.

#### КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АПФ

АПФ — цинкзависимая С-концевая карбоксидипептидаза (мол. масса 170 кДа), метаболизирует различные биологически активные пептиды (ангиотензин 1, брадикинин, Ас-SDKP и др.) и играет ключевую роль в регуляции кровяного давления и многих сердечно-сосудистых патологиях. Кроме того, этот фермент вовлечен в метаболизм нейропептидов, иммунную и репродуктивную функции,

передачу сигнала внутрь клетки [5, 6]. АПФ является гликопротеином и интегральным мембранным белком типа I и считается дифференцировочным антигеном — CD143 [7]. Основные функции в организме выполняет мембраносвязанная форма АПФ [8] на поверхности эндотелиальных, эпителиальных и нейроэпителиальных клеток (см. [9] и ссылки там), а также иммунных клеток — макрофагов и дендритных клеток [10, 11].

Под действием мембраносвязанной металлозависимой секретазы (которая до сих пор не идентифицирована) АПФ переходит в растворимое состояние в результате отщепления якорной последовательности [12]. Растворимый АПФ содержится в крови, семенной и других биологических жидкостях. Концентрация АПФ в биологических жидкостях считается весьма важным клиническим параметром. У здоровых индивидов уровень АПФ в крови достаточно стабилен [13], тогда как при саркоидозе [14] или болезни Гоше [15, 16] он значительно повышен. Кроме того, полиморфизм гена АПФ обеспечивает 3–4-кратные различия в концентрации АПФ в популяции [17, 18]. Наконец, мутации гена АПФ приводят либо к резкому уменьшению его экспрессии [19], либо к резкому увеличению слущивания АПФ (shedding) с поверхности клеток [20, 21], либо к непосредственной секреции из клетки [22, 23], что увеличивает концентрацию АПФ в крови в 5–15 раз соответственно.

В организме синтезируются две формы фермента — соматическая (тканевая) и тестикулярная. Соматическая форма АПФ состоит из двух гомологичных доменов (N и C) в составе одной полипептидной цепи, каждый домен содержит активный центр [24]. Тестикулярная форма представляет собой однодоменный фермент, почти полностью соответствующий С-домену. Точная трехмерная структура соматического АПФ пока неизвестна, но предложены ее модели, основанные на расшифрованных кристаллических структурах отдельных доменов и данных электронной микроскопии полноразмерного фермента [21, 25]. Повышенная экспрессия АПФ является одной из причин диабетической нефропатии, гипертонической болезни и ряда других сердечно-сосудистых патологий, поэтому ингибиторы АПФ, введенные в клиническую практику более 30 лет назад, стали лекарствами первого ряда при многих сердечно-сосудистых заболеваниях [26].

История, рассказанная ниже, есть иллюстрация того, что несмотря на отсутствие строгого научного обоснования органной специфичности АПФ, скрупулезная работа по получению и характеристике мАт к многочисленным эпитопам АПФ, проводимая в течение многих лет, привела не только к получению самых эффективных антител для направленной доставки лекарств и генов в эндотелий **легких**,

но и к разработке концепции **конформационного фингерпринтинга АПФ**, которая, в свою очередь, дала теоретические предпосылки к получению антител, специфичных к АПФ из разных органов.

### ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К АПФ ЧЕЛОВЕКА

Первая иммунизация мышей была проведена **смесью АПФ**, выделенных группой **И. Сахарова**, из разных органов человека [27–29]. Предполагалось, что позитивные клоны, отобранные в ELISA на смесь АПФ из разных органов, будут затем протестированы с АПФ из отдельных органов. Однако в результате ошибки (детергент Tween-20 (0.05%) не был добавлен в отмывочный буфер) мы получили в ELISA много ложноположительных популяций, которые позже не были подтверждены в более специфичном тесте — иммуносорбции с последующим определением ферментативной активности АПФ, преципитированного антителами против АПФ из тестируемых гибридом (immunocapture enzyme immunoassay) [30]. Поэтому следующую иммунизацию мы провели с АПФ из легких (который имелся в достаточном количестве).

Когда в 1983 году в нашем институте началась работа по получению МАт к различным белкам, безусловной удачей считалось просто получение хотя бы одного **МАт** (т.е. унифицированного реагента, вырабатываемого в неограниченных количествах), **специфически** связывающегося с интересующим белком с высокой **аффинностью**. Поэтому работу строили по одному шаблону (как до недавнего времени и во всем мире): проводили скрининг нескольких сотен гибридом и выбирали **одну популяцию** с самым сильным ответом, которую и клонировали для получения стабильной гибридомы, производящей антитела наивысшей аффинности.

Интуитивно я предполагал, что если получить **несколько** антител на **различные эпитопы** интересующего белка (в нашем случае АПФ), то такие антитела могут служить структурными и функциональными “пробами” на те участки антигена, где расположены их эпитопы. (Потом я нашел серию статей S.J. Tzartos, посвященных изучению рецептора ацетилхолина с помощью **панели** МАт на разные эпитопы [31], которые подтвердили мою правоту). Поэтому при первичном скрининге гибридом (полученных **Е. Алликметс (Садовниковой)** и **И. Трахтом**) в ELISA на АПФ из легких мы отбирали **ВСЕ** позитивные популяции (127), которые затем я проверял на антигенсвязывающую активность в тесте иммуносорбции [32], “отсекающем” возможные ложноположительные (в ELISA) “липкие” антитела (heterofilic antibodies) [33]. При таком подходе мы выделили **14** популяций гибридом,

продуцирующих **8** неидентичных антител против АПФ легких человека, которые затем клонировали и тщательно охарактеризовали [30].

Все восемь антител из первой успешной гибридизации “узнавали” эпитопы, расположенные на поверхности N-домена АПФ, из них два связывались с денатурированным АПФ в **блоттинге** (т.е. “узнавали” последовательность аминокислот — linear, continuous epitopes), тогда как остальные шесть антител связывались только с нативным, каталитически активным АПФ в растворе или иммобилизованным на пластике, т.е. “узнавали” конформационные (conformational, discontinuous) эпитопы. Также хотелось бы заметить, что все МАт из другой серии антител против АПФ, полученных Н. Towbin и F. Alhenc-Gelas и проанализированных в этой же статье [30], узнавали только линейные (continuous) эпитопы АПФ. Позитивные популяции гибридом в этой серии отбирали с помощью очищенного АПФ почек, меченного радиоактивным йодом. Скорее всего, при радиоактивном мечении АПФ подвергался значительной денатурации, поэтому при скрининге были отобраны только антитела, узнающие линейные эпитопы. Позже мы показали, что даже простая сорбция каталитически активного АПФ на пластик для проведения ELISA приводит к частичной денатурации АПФ [34]. Поэтому для получения МАт против конформационных эпитопов АПФ (и, видимо, других белков) при отборе возможных гибридом имеет смысл использовать только каталитически активный АПФ (или другой нативный антиген) в **растворе**, так как любые манипуляции с АПФ (в том числе, и простая сорбция на пластик) приводят к его частичной денатурации.

Естественно, мы хотели получить также панель МАт, узнающих эпитопы и на поверхности С-домена АПФ, поэтому вместе с **И. Балясниковой** получили два набора МАт против линейных (денатурированных) и нативных (конформационных, discontinuous) эпитопов на поверхности С-домена человека и детально их охарактеризовали [35, 36]. Для того чтобы исключить возможный маскирующий эффект N-домена на иммунный ответ на эпитопы, расположенные на С-доме АПФ (вследствие возможного физического закрытия части С-домена глобулой N-домена [37]), мышей иммунизировали очищенным рекомбинантным тестикулярным АПФ (синтезированным в клетках СНО), который содержит только С-домен. В результате получили еще восемь антител против конформационных эпитопов и восемь антител против денатурированных эпитопов на С-доме АПФ человека. Еще несколько лет было потрачено на полное эпитопное картирование всех этих МАт [34–36, 38–42], проведенное совместно с группами **О. Кост** (Московский государственный

университет) и **E. Sturrock** (University of Cape Town, South Africa).

Когда мы закончили эпитопное картирование всех антител против АПФ человека, стало ясно, что получен новый мощный инструмент для исследования АПФ. Во-первых, мы показали, что связывание некоторых антител очень чувствительно к тонким изменениям конформации АПФ, вызванным локальной денатурацией или инактивацией, связыванием ингибиторов, антител или некоторыми болезнями [34, 39, 40, 43–45]. Во-вторых, появилась возможность детектировать и локализовать мутации АПФ человека [21–23, 46–49]. И, наконец, **была** сформулирована концепция **конформационного фингерпринтинга АПФ** с помощью мАт [50], которая, в свою очередь, позволила доказать тканевую специфичность АПФ, имеющую, похоже, очень большие научные и, как минимум, диагностические перспективы.

Поскольку конформационный фингерпринтинг может быть применен к любому белку-антигену, к разным эпитопам которого имеется **НЕСКОЛЬКО** антител, концепцию тканевой специфичности также можно применить к любому гликопротеину. Рассмотрим эту концепцию более подробно.

### КОНФОРМАЦИОННЫЙ ФИНГЕРПРИНТИНГ АПФ

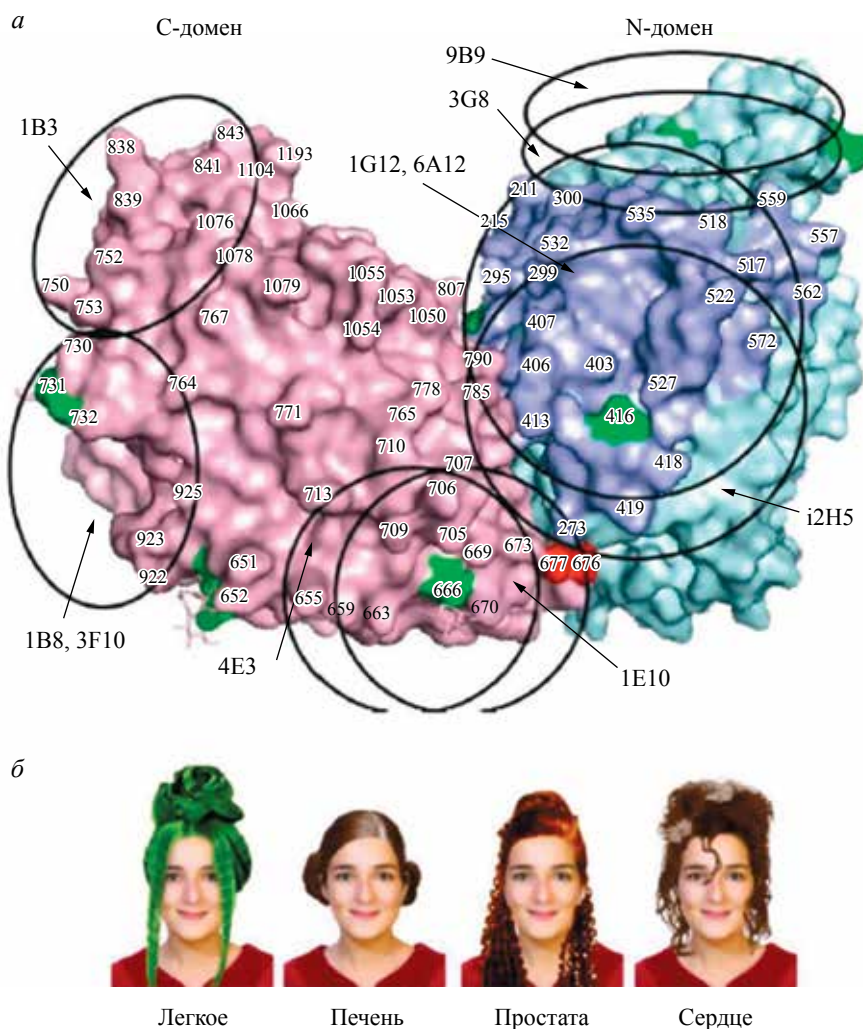
За прошедшие годы в моей лаборатории было получено и охарактеризовано более 40 мАт как направленных к различным последовательностям аминокислот в составе полипептидной цепи АПФ, так и распознающих конформационные эпитопы на поверхности фермента человека, крысы, мыши и других видов [30, 32, 34–36, 51–53]. Эти мАт с успехом применяли для количественного определения АПФ с помощью ELISA [18], проточной цитофлуориметрии [11, 50, 54], блотинга [34, 38] и иммуногистохимических методов [55]. Во всех этих методах использовали то или иное, но всегда одно антитело (в крайнем случае, два [46]). Однако постепенно стало понятно, что принципиально новую информацию о структуре и функционировании АПФ можно получить, если попытаться использовать **набор** мАт.

Когда мы закончили картирование эпитопов для мАт на молекуле АПФ, то заметили, что все 16 мАт на конформационные эпитопы АПФ человека содержат потенциальные сайты гликозилирования (рис. 1а), которых в молекуле АПФ всего 17 (10 в N-домене и семь в С-домене) [24]. Поскольку за гликозилирование белков человека отвечает сочетанная работа более 100 генов [56], можно было предположить (и этому получены экспериментальные подтверждения), что сочетанная экспрессия этих генов (а значит, и гликозилирование одного и того же белка)

должна различаться в разных органах [57]. Схематично это можно представить так: ген АПФ, кодирующий аминокислотную последовательность белка, одинаков во всех органах (как и лицо моей дочери), тогда как набор сахаров (гликанов), декорирующих различные сайты гликозилирования АПФ (а значит, и поверхностную конформацию АПФ), различен в разных органах (как и прически моей дочери, рис. 1б). Использование набора из 16 мАт, направленных к различным эпитопам на поверхности обоих доменов АПФ человека, показало, что “рисунок” (конформационный фингерпринт), характеризующий эффективность связывания **набора** мАт, различен у рекомбинантного АПФ человека, экспрессированного в разных клетках (СНО против НЕК) или в одних и тех же клетках (СНО), но при разных условиях культивирования, или у нативного АПФ в разных клетках человека – эндотелиальных клетках против макрофагов [50].

На примере фенотипирования АПФ при различных болезнях мы показали, что конформация поверхности АПФ, синтезированного в разных тканях/клетках *in vivo*, также различается. По моим приблизительным оценкам в нормальных условиях АПФ в плазме крови примерно на 75% происходит из эндотелиальных клеток капилляров легких. Эта оценка основана на том, что: 1) 30% всех капилляров расположены в легких [58]; 2) почти 100% капилляров легких экспрессируют АПФ против 10–15% АПФ-позитивных капилляров сосудистого русла в системной циркуляции [9]. Как я уже упоминал, у здоровых доноров уровень АПФ в крови довольно стабилен, тогда как при саркоидозе или болезни Гоше наблюдается значительное повышение уровня АПФ в крови. Саркоидоз – системное гранулематозное заболевание, при котором поражаются, в первую очередь, легкие, а при генерализации процесса – лимфоузлы, сердце, печень, селезенка и даже головной мозг. В органах, содержащих саркоидные гранулемы, уровень АПФ в несколько раз выше (до 10–15 раз), чем в непораженных [59]. Именно саркоидные гранулемы являются источником повышенного содержания АПФ в крови. Таким образом, при развитии этих заболеваний в крови, помимо АПФ, поступающего из эндотелиальных клеток легкого, будет присутствовать фермент, продуцируемый макрофагами и дендритными клетками (рис. 4 в [50]), конформация поверхности которого может отличаться. Анализ связывания мАт с АПФ в плазме больных саркоидозом (уровень активности АПФ повышен в 2–4 раза по сравнению с нормой) и у здоровых доноров выявил отличия в связывании нескольких мАт. А именно, при саркоидозе наблюдается более высокое статистически значимое связывание мАт 3G8, 1G12 и 6A12 к N-домену фермента, а также мАт 1B3, 1E10 и 3F11 к С-домену (рис. 2а). Еще более сильными были различия в конформации АПФ из легких и лимфатических

## Эпитопы мАт на поверхности АПФ человека

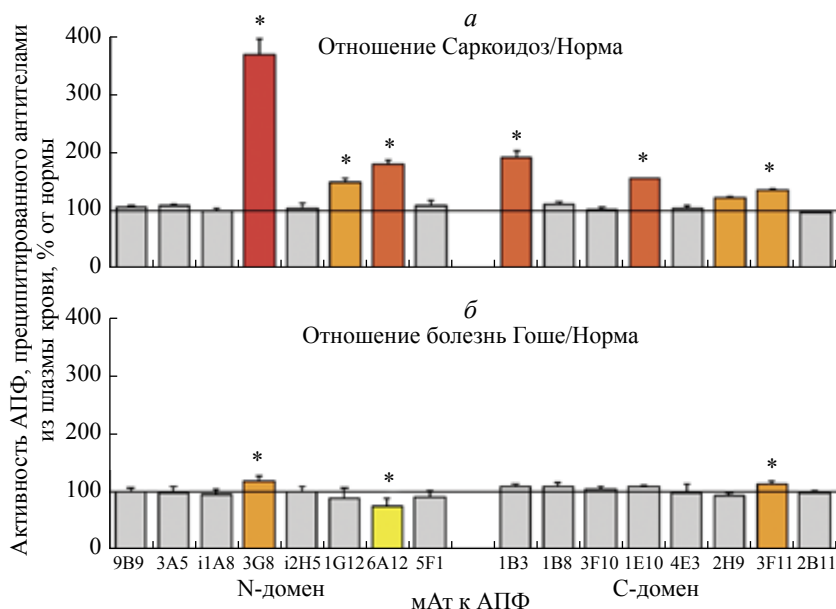


**Рис. 1.** Конформационный фингерпринтинг АПФ. *а* – Эпитопы мАт к АПФ содержат потенциальные сайты гликозилирования. Модель взаимного расположения N- и C-доменов внутри двухдоменного соматического АПФ была основана главным образом на результатах картирования эпитопов мАт 1G12 и 6A12 на N-домене (синий цвет) и мАт 1E10 и 4E3 на C-домене. Область эпитопов показана кругами диаметром примерно 25–30 Å, что соответствует площади 600–900 Å<sup>2</sup>. Большинство эпитопов содержит потенциальные сайты гликозилирования – окрашено зеленым (рисунок адаптирован из рис. 1 в [50]). *б* – Схема, иллюстрирующая концепцию конформационного фингерпринтинга АПФ. Одинаковое лицо девушки на всех картинках отражает наличие одного гена, кодирующего аминокислотную последовательность молекулы АПФ в разных органах (и клетках) человека. Разные прически означают, что гликозилирование АПФ в разных органах и клетках может существенно отличаться, что приводит к различиям в локальной поверхностной конформации АПФ в разных органах и клетках.

узлов у больных саркоидозом и в контрольной группе (рис. 5 в [50]).

Аналогичное исследование было проведено с АПФ из плазмы и тканей при болезни Гоше, при которой уровень активности АПФ в плазме в 3–10 раз выше, чем в норме. Это заболевание характеризуется активацией макрофагов (и резким увеличением экспрессии АПФ в этих клетках) в селезенке [16] и печени [наши неопубликованные данные] из-за накопления негидролизованного глюкоцереброзида во всех клетках организма, но преимущественно в макрофагах,

в результате мутации гена, кодирующего лизосомную глюкоцереброзидазу [61]. Связывание большинства мАт с АПФ крови при этой патологии не изменяется, однако наблюдается статистически значимое изменение связывания мАт 3G8 и 6A12 (N-домен АПФ) и мАт 3F11 (C-домен АПФ) (рис. 2б). Хотя при обоих заболеваниях источником повышенного уровня АПФ в крови является фермент из активированных макрофагов, видимые и существенные различия конформационного фингерпринта АПФ (рис. 2) подтверждают тезис о тканевой специфичности АПФ: даже АПФ, продуцируемый одинаковыми клетками



**Рис. 2.** Конформационный фингерпринтинг АПФ плазмы крови. АПФ из плазмы крови был преципитирован на поверхность 96-ячеечного микротеста с помощью 16 мАт мыши на различные эпитопы АПФ, иммобилизованных в ячейках через сорбированные аффинно очищенные иммуноглобулины козы против иммуноглобулинов мыши (goat-anti-mouse bridge). Активность преципитированного АПФ измеряли прямо в лунке после отмывки не связанного АПФ и инкубации с ZPHL, субстратом АПФ [30]. Эта активность представлена как нормализованная величина – отношение активности АПФ, преципитированного из плазмы больных, к активности АПФ из плазмы здоровых лиц (с учетом разной внесенной активности). *а* – Пул от четырех пациентов с саркоидозом (против пула из пяти контрольных образцов плазмы) использован для оценки конформации АПФ при саркоидозе (адаптирован из рис. 7 в [50]). *б* – Пул от 10 образцов плазмы пациентов с болезнью Гоше (против пула от семи контрольных образцов) использован с этой же целью в случае болезни Гоше (адаптирован из рис. 2 в [60]). Данные представлены как среднее значение, определенное по результатам не менее трех измерений в случае антител, связывание которых с АПФ от пациентов изменялось меньше, чем на 20% по сравнению с контролем (окрашено серым), и 8–12 измерений, если изменения превышали 20%. Указанное отношение (“binding ratio”) при его увеличении более чем на 20% от нормы окрашено оранжевым, на 50% – светло-коричневым, на 100% – красным, тогда как уменьшение более чем на 20% показано желтым. Звездочками отмечены статистически значимые различия,  $p < 0.05$ .

(макрофагами), но в разных органах (или при разных болезнях – саркоидоз против болезни Гоше), имеет разную поверхностную конформацию.

Мы проанализировали также возможность присутствия конформационно измененного АПФ в крови больных уреимией – заболеванием, которое характеризуется чрезвычайно высоким уровнем токсинов в крови. Оказалось, что и в этом случае эффективность связывания двух мАт с АПФ плазмы больных уреимией отличалась от эффективности связывания этих мАт с АПФ плазмы крови здоровых доноров. Отмечены статистически значимые различия в эффективности связывания мАт 1G12 к N-домену и мАт 1B3 к C-домену фермента у четырех пациентов из 20 (рис. 3 в [45]). Изменения затронули не только поверхность белка, но повлияли и на его каталитические функции. Оказалось, что конформационно измененный АПФ характеризуется повышенной (до 4 раз) активностью по отношению к природному субстрату, ангиотензину I, менее эффективно ингибируется специфическим ингибитором АПФ эналаприлатом (аналог трипептида, широко применяемый

в качестве гипотензивного средства) и почти не ингибируется другим ингибитором АПФ – нонапептидом тепротидом. Мы также проанализировали большую выборку плазмы крови здоровых доноров [48] и больных без уремии [62] и обнаружили восемь случаев такого же конформационно измененного АПФ, как при уремии – менее подверженного действию специфических ингибиторов [45]. Таким образом, пациентам, в крови которых присутствует такой конформационно измененный АПФ, вероятно, следует назначать более интенсивную терапию ингибиторами АПФ, либо заменять их антигипертензивными средствами другого класса.

Проведенные нами пилотные исследования по фенотипированию АПФ из разных тканей и при разных болезнях человека показали, что связывание панели мАт, направленных к различным эпитопам на поверхности АПФ, различается как в случае АПФ из разных тканей, так и при разных болезнях. Полученные данные позволяют заключить, что существуют также различия в локальной

конформации поверхности АПФ, продуцируемого различными тканями/клетками.

Какова может быть природа этих различий? Прежде всего, различия в поверхности фермента могут быть обусловлены заменами аминокислотных остатков в его полипептидной цепи. Однако АПФ кодируется одним геном, а известные к настоящему времени мутации, затрагивающие белковую часть АПФ, достаточно редки и никак не могут быть связаны с различиями поверхности фермента в разных тканях одного и того же индивида. Гораздо более вероятно, что наблюдаемые различия обусловлены посттрансляционными модификациями глобулы белка, которая, по образному выражению, представляет собой “functional decorating”, т.е. “украшение со смыслом”. Посттрансляционные модификации могут включать фосфорилирование, сульфатирование, метилирование, ацетилирование и др. [63]. Но для такого белка, как АПФ, типичного гликопротеина с высоким содержанием углеводов, такой посттрансляционной модификацией является, в первую очередь, гликозилирование, которое может отличаться у белков, синтезируемых в разных тканях, как по степени, так и по структуре.

Наиболее вероятно, что АПФ, продуцируемые легочной тканью, а также измененными макрофагами при болезни Гоше или саркоидными гранулемами при саркоидозе, различаются характером гликозилирования. Эпитоп связывания мАт 3G8 (связывание которого с АПФ крови изменено и при болезни Гоше, и при саркоидозе, рис. 2) содержит два потенциальных сайта гликозилирования – Asn25 и Asn82 на N-домене фермента. Эпитопы мАт, эффективность связывания которых изменяется при саркоидозе, содержат следующие потенциальные сайты гликозилирования: Asn416 (мАт 1G12 и 6A12) на N-домене фермента, а также Asn666 (мАт 1E10) и Asn1196 (мАт 1B3) на C-домене. Таким образом, можно заключить, что различия в степени гликозилирования и/или в структуре олигосахаридных цепей в указанных сайтах являются основой различий в связывании мАт с АПФ крови в норме и при развитии указанных патологий.

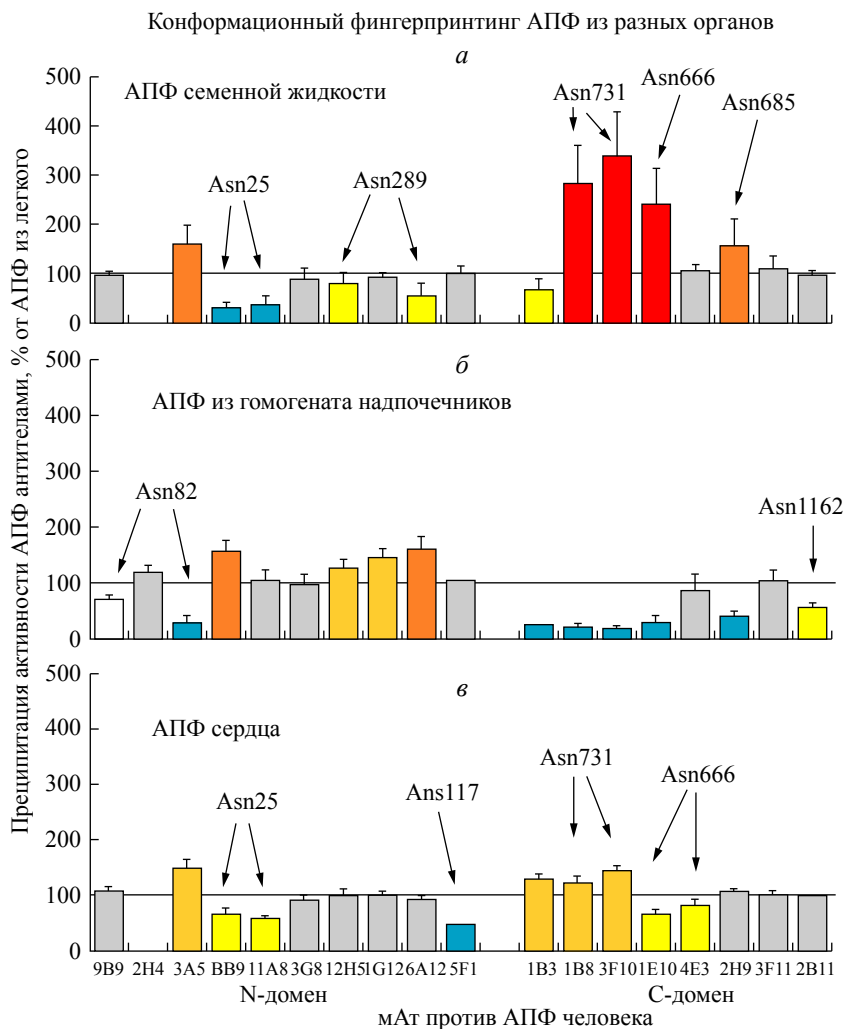
Прямые доказательства различий в гликозилировании АПФ, синтезируемых в разных клетках и органах, получены при сравнении конформации АПФ семенной жидкости (вырабатываемого эпителиальными клетками предстательной железы и эпидидимиса) и АПФ легких (продуцируемого эндотелиальными клетками капилляров) [62]. Связывание 10 мАт (из 17 тестируемых) с АПФ из семенной жидкости отличалось от связывания с АПФ из легких (рис. 3а). Масс-спектрометрический анализ триптических фрагментов АПФ из этих препаратов выявил различия в гликозилировании сайтов, находящихся в эпитопах мАт, которые по-разному связывались с этими препаратами (табл. 2 в [62] и рис. 4). Дальнейшее

подтверждение различной конформации АПФ, экспрессированных в разных тканях (т.е. тканевой специфичности), получено при анализе конформации АПФ из надпочечников, ткань которых имеет нейрональное происхождение (рис. 3б), и АПФ из сердца (рис. 3в), который вырабатывается не только капиллярами сердца, но и миофибробластами [64], в отличие от АПФ легкого (продуцируемого только капиллярами [9]).

Таким образом, существуют структурные обоснования тканевой специфичности АПФ (как минимум, различные гликаны на некоторых сайтах гликозилирования АПФ из разных органов), что открывает теоретические возможности получения мАт, специфичных к АПФ из разных органов. При пилотной иммунизации мышей очищенным АПФ из семенной жидкости, мы показали, что существуют лимфоциты, продуцирующие антитела, дискриминирующие АПФ семенной жидкости и АПФ легких (рис. 7 в [62]). Следовательно, при систематическом подходе можно получить такие дискриминирующие антитела.

Есть ли практическая польза от антител, специфичных к АПФ из разных органов? По нашему мнению, безусловно есть, так как такие антитела позволят **количественно** оценивать поступление в кровь АПФ из разных органов, доля которых может изменяться при патологии этих органов. В качестве первого примера отметим возможность применения “конформационного фингерпринтинга” АПФ в кардиологии, разрабатываемого в настоящее время нами совместно с лабораториями **Е. Голуховой** (Национальный научно-практический центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева, Москва) и **О. Кост** (МГУ). Еще в 2000 году было установлено (с помощью нашего мАт 5F1), что экспрессия АПФ увеличена в тканях сердца и, в частности, в предсердиях при фибрилляции предсердий [66]. Также ранее было показано, что экспрессия АПФ повышена в гипертрофированном сердце и мелких сосудах миокарда у внезапно умерших больных (Bohle, Franke, Metzger, Danilov et al., неопубл.). Важную роль АПФ сердца в развитии сердечной патологии выявили и исследования, проведенные на трансгенных мышшах, у которых уровень экспрессии АПФ в тканях сердца был в 100 раз выше, чем обычно. У этих мышшей оба предсердия (и левое, и правое) были увеличены в 3 раза, а электрокардиографическое исследование выявило фибрилляцию предсердий. Более того, эти мышши имели высокую предрасположенность к внезапной смерти [67]. Таким образом, именно увеличение экспрессии АПФ в сердце может быть причиной развития фибрилляции предсердий и, в конечном счете, приводить к внезапной смерти.

По нашим оценкам доля АПФ сердца в общем содержании АПФ в крови не превышает 1%. Таким



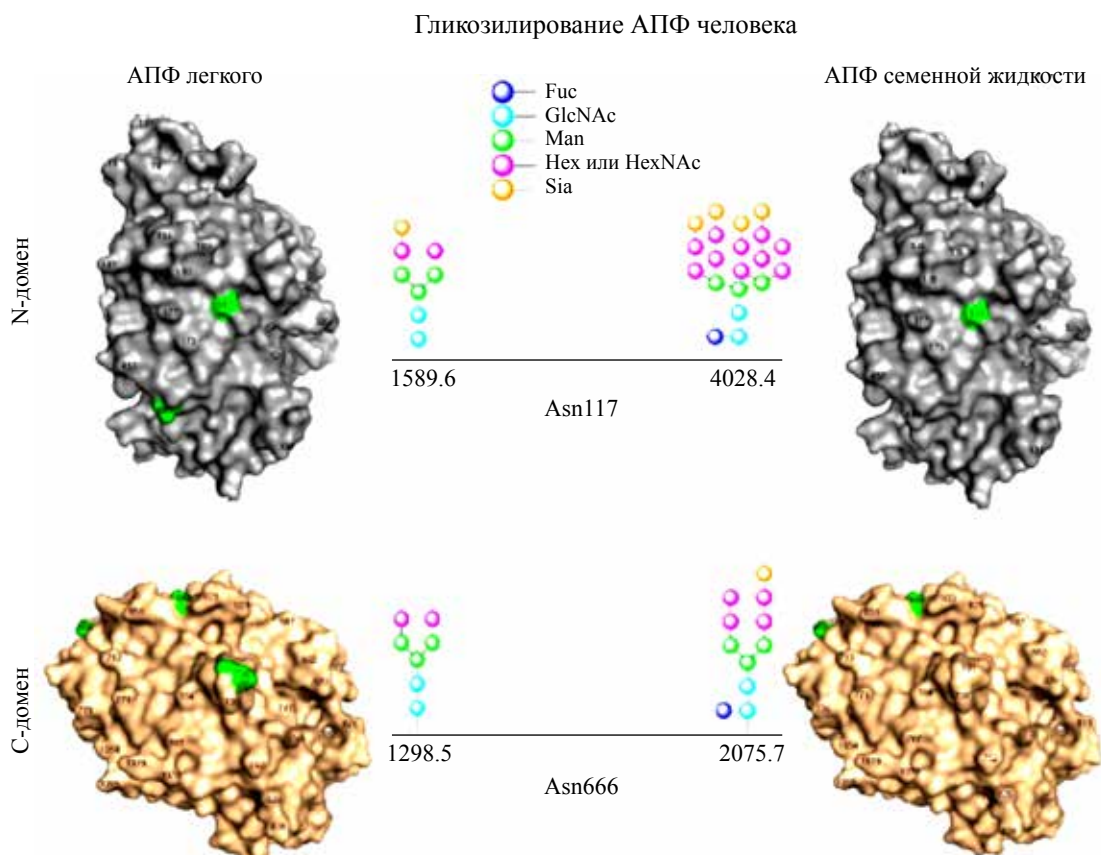
**Рис. 3.** Конформационный фингерпринтинг АПФ из разных органов. Активность АПФ в очищенных препаратах АПФ из семенной жидкости (а) и сердца (в), а также из гомогената надпочечников (б) была преципитирована и представлена как на рис. 2. Уменьшение отношения (преципитация активности АПФ из данного органа к активности АПФ из препарата легких – “binding ratio”) более чем на 50% от нормы показано синим. (Часть а адаптирована из рис. 1А [62], часть в – из рис. 3 [65]).

образом, даже увеличение содержания АПФ из сердца в крови в 3 раза не может заметно повлиять на общую активность фермента в крови. Однако долю АПФ сердца, “приходящую” в кровь и “дополняющую” АПФ, поступивший в кровь из легких, можно оценить и выявить таким образом больных с увеличенной экспрессией АПФ в сердце, если иметь антитела, специфически “узнающие” только АПФ сердца человека (рис. 5). Эффективность связывания ряда мАт как к N-, так и к С-домену АПФ с ферментом из тканей сердца значительно и статистически значимо отличается от эффективности связывания тех же мАт с АПФ из тканей легких. Эти различия мы можем, прежде всего, отнести к различиям в гликозилировании следующих потенциальных сайтов гликозилирования: Asn25 на N-домене фермента, а также As666 и Asn731 на С-домене (рис. 3в). Выявленные

различия могут служить основой для получения мАт, специфично распознающих АПФ, продуцируемый тканями сердца, для дальнейшей разработки клинического метода ранней диагностики аритмии.

Очень вероятно, что такие тканеспецифичные антитела против АПФ могут быть пригодны для ранней диагностики рака в данном органе. В норме АПФ, вырабатываемый в глубине данной ткани клетками, отличными от эндотелиальных (например, клетками саркоидных гранулем в легких или эпителиальными клетками предстательной железы), в кровь не попадает. Поэтому при саркоидозе легкого содержание АПФ в крови не увеличено [68], несмотря на его огромную концентрацию внутри гранулем (рис. 4 в [50]) и повышение концентрации АПФ в семенной жидкости в 50 раз по сравнению с концентрацией в крови



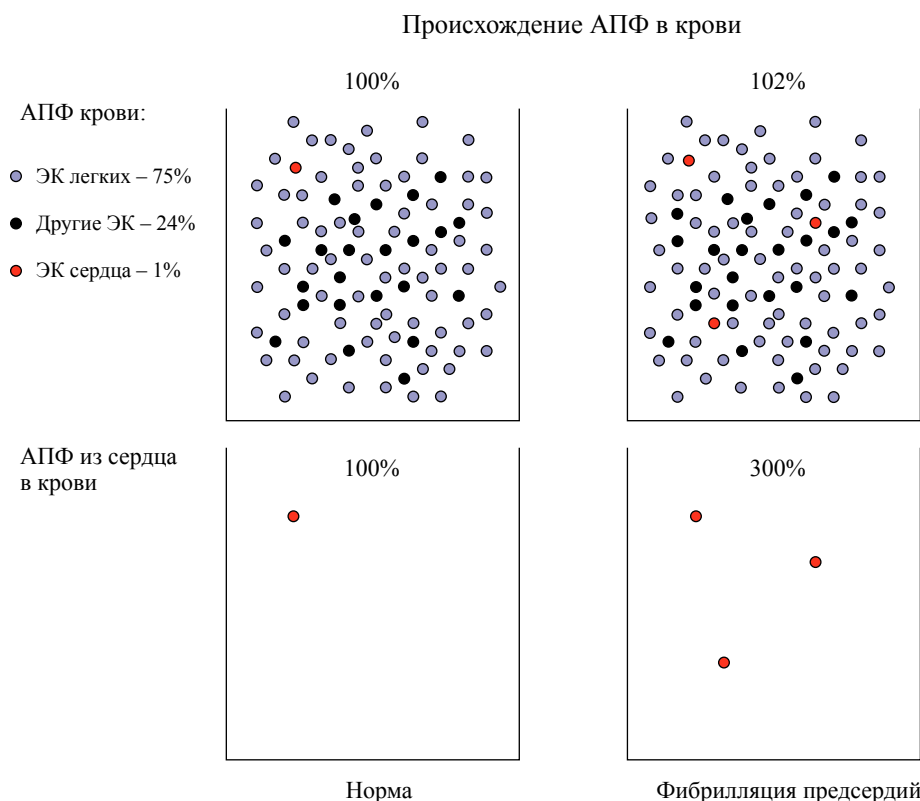


**Рис. 4.** Различия в гликозилировании АПФ из разных органов. Различия в гликозилировании АПФ из семенной жидкости и легких, выявленные при помощи масс-спектрометрии их триптических фрагментов и представленных в табл. 2 в [62], показаны графически. Asn480, гликозилированный в N-домене АПФ легкого (выделен зеленым), не гликозилирован в АПФ семенной жидкости (как и Asn731 в C-домене АПФ легкого), тогда как Asn117 в N-домене АПФ и Asn666 в C-домене АПФ по-разному гликозилированы в АПФ легкого и семенной жидкости.

[69]. При развитии опухолевого процесса в органах резко возрастает экспрессия VEGF [70, 71], который, ко всему прочему, резко увеличивает проницаемость капилляров в опухолевой ткани через увеличение эндотелиальной фенестрации [72]. Можно ожидать, что АПФ, синтезированный в глубине органа, пораженного опухолью, появится в крови, где он будет детектирован антителом, специфичным к АПФ этого органа. Совместно с **М. Paduch** и **А. Kossiakoff** (University of Chicago, USA) и **О. Кост** (МГУ) нам удалось отобрать (из синтетической фаговой библиотеки человеческого происхождения) Fab-фрагмент, преимущественно связывающийся с АПФ легких, а буквально пару месяцев назад вместе с **И. Поповой** (Northwestern University, Evanston, IL, USA), **А. Любимовым** (University of Illinois at Chicago, USA) и **О. Кост** (МГУ) мы получили мАт, специфичное к АПФ из эпителиальных клеток (и, в частности, эпителия предстательной железы, которое не “узнает” АПФ легкого (неопубликованные данные)).

#### НАПРАВЛЕННАЯ ДОСТАВКА ЛЕКАРСТВ И ГЕНОВ В ЭНДОТЕЛИЙ ЛЕГКОГО С ПОМОЩЬЮ МАТ ПРОТИВ АПФ

Первоначальной задачей проекта было получение мАт против органоспецифичного эндотелия, которые можно использовать для направленной доставки лекарств в разные органы. Одно из мАт против АПФ, полученных в первой серии (9В9), узнавало АПФ не только человека, но и крысы [32] (а также хомяка и кошки), правда, в значительно меньшей степени [30], что позволило проследить судьбу этих мАт после внутривенного введения. Мы обнаружили (совместно с **В. Музыкантовым**), что радиоактивно меченные мАт 9В9 чрезвычайно эффективно (до 50% от введенной дозы [73] и специфично (в 30–50 раз больше, чем в других органах и крови) накапливаются в легком [74–76]. Позже мы картировали эпитоп для мАт 9В9 [42] и определили причину специфического накопления мАт в легком. Дело в том, что 100% капилляров легких экспрессируют АПФ (против 5–15% АПФ-позитивных капилляров в системной



**Рис. 5.** Влияние фибрилляции предсердий на активность АПФ в крови. По нашим оценкам, АПФ крови на 75% представлен АПФ, “слущенным” с поверхности эндотелиальных клеток (ЭК) капилляров легких, тогда как доля АПФ, пришедшего в кровь из сердца, вряд ли больше 1%. В этом случае при увеличении экспрессии АПФ в 3 раза при фибрилляции предсердий [66] активность АПФ крови может увеличиться более чем на 2%, что не может “замечать” ни один клинический тест, так как активность АПФ в популяции варьирует в 3–4 раза [13, 18]. Однако в случае получения антител, специфически “узнающих” только АПФ из сердца, обнаружение трехкратного увеличения активности такого АПФ у больных с риском развития фибрилляции предсердий может стать тривиальной задачей. Рисунок адаптирован из рис. 9 в [65].

циркуляции) [9], тогда как в здоровых почках ни эндотелий клубочков, ни межклубочковый эндотелий вообще не продуцируют АПФ [9]. Такая гетерогенная экспрессия АПФ вдоль сосудистого русла с преимущественной экспрессией в капиллярах легкого обеспечивает специфичное накопление антител в легком при системном введении.

За прошедшие 30 лет было сделано много попыток использовать мАТ к другим эндотелиальным антигенам для доставки лекарств/генов в легкие [77], однако наиболее удачное сочетание специфичности и эффективности показали мАТ против АПФ [76]. Так, кроме мАТ против АПФ (CD143), при перфузии изолированного легкого в капиллярах специфично и эффективно накапливаются также мАТ против эндотелиальных антигенов PECAM-1 (CD31), ICAM-1 (CD54), Thy-1.1 (CD90.1) и OX-43. Однако при системном введении в легких специфично накапливаются только мАТ против АПФ [76]. мАТ против аминопептидазы Р накапливается в легком при системном введении даже более специфично, чем мАТ против АПФ (отношение легкое/кровь равно 124 для

мАТ 833с [78] против 23 для мАТ 9В9 [73]), поэтому может быть использовано для гамма-сцинтиграфии капилляров легкого [78] (наряду с мАТ против АПФ [74, 75]). Однако экспрессия аминопептидазы Р в капиллярах легкого, хотя и очень специфичная, но очень незначительная (по сравнению с количеством АПФ, экспрессированным в легких человека – примерно 20 мг, по нашим оценкам), что не позволяет использовать это мАТ для доставки в легкое терапевтически значимых количеств лекарственных средств (белков, генов, малых молекул, частиц).

Другое замечательное преимущество АПФ в качестве мишени для доставки лекарств в легкое (и мАТ против АПФ в качестве вектора) состоит в очень низком уровне экспрессии АПФ в капиллярах печени [9]. Дело в том, что “немедленное” накопление липосом и вирусов в печени (основных носителей генного материала при генной терапии) при системном введении представляет огромную проблему для адресной доставки генного материала (в липосомах или вирусах, обшитых специфичными антителами) в другие органы. Чрезмерное накопление

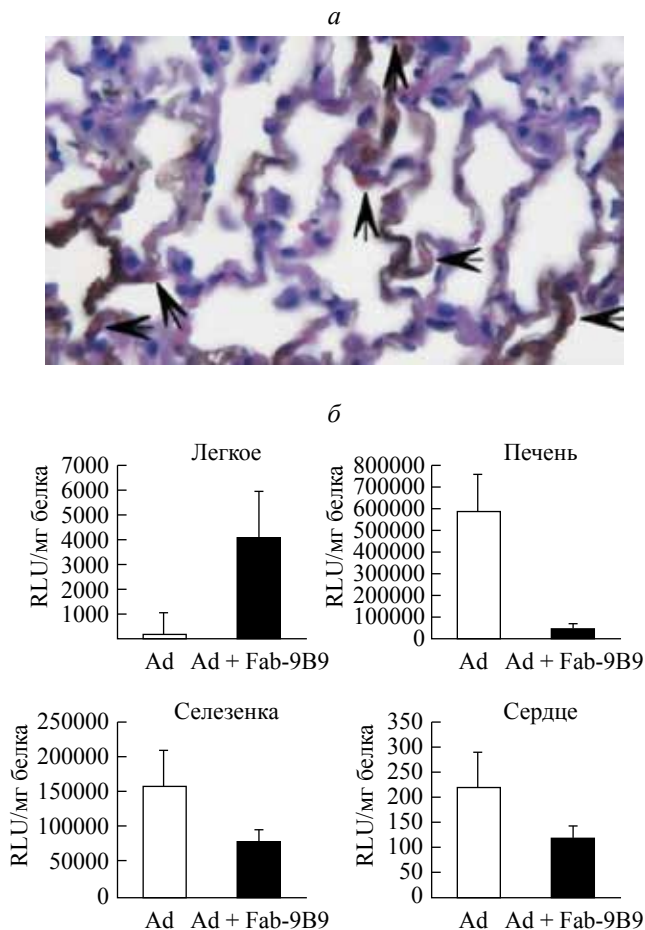
аденовирусов в печени даже стало причиной смерти одного из первых пациентов, подвергнутых генной терапии в 1999 году [79]. Когда мы “обшили” (с помощью биспецифического реагента) аденовирусы мАТ против АПФ (9В9), то обнаружили не только увеличение в 20 раз специфического накопления таких “адресных” вирусов в легком, но и уменьшение в 5 раз накопления вирусов в печени [80]. Таким образом, специфическое накопление генного материала в легком увеличилось в 100 раз по сравнению с накоплением в печени (рис. 6).

Мы досконально исследовали феномен накопления мАТ против АПФ (более 30 публикаций), разработали эффективные методы доставки терапевтических белков [81–85] и генов [80, 86] в эндотелий легких и на различных экспериментальных моделях показали устойчивый терапевтический эффект такой доставки генов [87–90].

Доставка в капилляры легкого антиоксидантных ферментов (для предотвращения окислительного повреждения легких в результате ишемии) могла бы резко повысить процент пригодности для трансплантации иммунологически совместимого донорского легкого после транспортировки. В настоящее время процент пригодности легкого составляет всего 20% [91], по сравнению с 95% для сердца и почек. Кроме того, такой подход может использоваться при острой дыхательной недостаточности (ARDS), вызванной острым окислительным повреждением легкого. Инъекция каталазы, конъюгированной с антителами против АПФ, резко повышала устойчивость легких крысы к различным вариантам окислительного повреждения [82–85].

Доставка в капилляры легкого гена синтазы оксида азота (*NOS*) предотвращала увеличение давления крови в сосудах крыс со спонтанной гипертензией [87], а доставка гена рецептора морфогенетического белка кости (*BMPR2*) [88, 89] или эндотелиального *Thp1* [90] уменьшала развитие легочной гипертензии в крысиных моделях гипоксии. Доставка в эндотелий легкого донора генов, экспрессия которых предотвращает реакцию отторжения трансплантата, могла бы быть полезной при трансплантации легких.

Несмотря на примеры вполне успешного применения мАТ против АПФ, химически конъюгированных с терапевтическими белками или с мАТ против поверхностного белка аденовируса (knob), было ясно, что для дальнейшего развития этого подхода и, в первую очередь, его возможного клинического применения, необходимо клонировать ген антитела против АПФ, чтобы получить в дальнейшем генно-инженерными методами конъюгаты с терапевтическими белками (fusion proteins) или с белками поверхности вирусов, или с поверхностью наночастиц.



**Рис. 6.** Специфичность доставки репортерного трангена в легкие через мАТ к АПФ. *a* – Легкие крысы, трансфицированные *in vivo* аденовирусами с репортерным трансгеном (CEA) и “обшитые” мАТ против АПФ, окрашены антителами против CEA. Экспрессия трансгена – коричневое окрашивание, которое отсутствовало в легких крыс, трансфицированных вирусами с трансгеном, но не “обшитых” антителами против АПФ (адаптировано из рис. 6А в [80]). *б* – Активность репортерного гена (люциферазы) оценивали в разных органах крысы через 3 дня после введения в хвостовую вену аденовирусов (AdCMVLuc,  $2 \times 10^9$  БОЕ) и выражали через люциферазную активность (RLU), нормированную на 1 мг белка. Представлены средние данные трех опытов + SEM (адаптировано из рис. 4А в [80]). Экспрессия репортерного гена из вируса, “обшитого” мАТ против АПФ, увеличивалась в легких в 20 раз (левый верхний график) и уменьшалась в печени в 5 раз (правый верхний график).

Следует отметить, что фантастические успехи применения мАТ в клинике (в первую очередь, в онкологии) связаны с развитием генно-инженерных методов клонирования и экспрессии генов мАТ, получением функциональных фрагментов антител (Fab, scFv, monobodies, diabodies, etc.) и разнообразных конъюгатов, включая биспецифические антитела – то, что

сейчас называется Antibody Engineering ([92] и статьи из данного номера [Недоспасов и др.]).

Нам удалось клонировать гены тяжелых и легких цепей наиболее используемого мАт 9В9 и получить его фрагмент (scFv). Однако аффинность связывания этого фрагмента упала на два порядка [93]. Тем не менее, наши результаты позволяют надеяться на успешное клиническое применение этого подхода, невозможного, однако, при использовании мАт мышиноного происхождения. Дело в том, что получение первых антител (особенно к опухолевым антигенам) породило необычайное оживление в биомедицинском и биотехнологическом мире, так как казалось, что вот-вот появится “магическая пуля” для лечения рака. Однако довольно скоро стало понятно, что мышинные мАт не могут использоваться в качестве терапевтических, так как инъекции таких мАт приводят к существенной выработке у человека антител против иммуноглобулинов мыши – Human-Anti-Mouse Antibodies (НАМА) response. Поэтому в 80-х годах стали разрабатываться различные подходы к “гуманизации” мышинных мАт и к получению антител с использованием “гуманизированных” мышей [94].

Альтернативой “мышинному” подходу к получению мАт, пригодных для клинического (в том числе и терапевтического) применения, стала разработка фаговых синтетических библиотек, содержащих фрагменты антител, экспрессированных на поверхности фага M13. Поэтому мы (совместно с **М. Paduch**, **А. Kossiakoff** и **О. Коэр**) запустили проект селекции Fab-фрагментов человеческого происхождения против АПФ человека из очень представительной (10<sup>10</sup> вариантов) синтетической фаговой библиотеки на основе известного антитела – Герцептина [95].

В настоящее время отобрано 16 неидентичных фагов, несущих на поверхности высокоаффинные (порядка 20 пМ) Fab-фрагменты человеческого происхождения против АПФ человека, которые могут быть пригодны для клинического применения – доставки терапевтических белков и/или генов в капилляры легких человека.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Проведенные исследования АПФ показали, что “рисунок” (конформационный фингерпринт), характеризующий эффективность связывания **набора** мАт, направленных к различным эпитопам на поверхности обоих доменов АПФ, является чрезвычайно чувствительным маркером изменения локальной конформации фермента (например, при денатурации, инактивации, связывании ингибиторов, антител и различных мутаций). Поскольку эпитопы связывания всех мАт из этого набора уже охарактеризованы, то по изменению связывания того или иного

мАт с АПФ можно судить о том, на каком именно участке поверхности белка произошли изменения.

2. Фенотипирование АПФ человека из разных тканей и органов убедительно показало, что панель мАт, направленных к различным эпитопам на поверхности АПФ, по-разному связывается с АПФ. Это означает, что конформация поверхности АПФ, экспрессируемого различными тканями/клетками, также различается.

3. Наблюдаемые различия обусловлены посттрансляционными модификациями АПФ, которые могут включать фосфорилирование, сульфатирование, метилирование, ацетилирование и др. Но для АПФ, типичного гликопротеина с высоким содержанием углеводов, такой посттрансляционной модификацией является, в первую очередь, гликозилирование, которое отличается у белков, синтезируемых в разных тканях, как по степени гликозилирования, так и по структуре гликанов.

4. Тканевая специфичность АПФ, выявленная нами с помощью конформационного фингерпринтинга, создает структурную предпосылку для получения мАт, специфичных к АПФ из разных органов, что, в свою очередь, может резко расширить диагностические возможности.

5. Получение мАт на максимальное количество эпитопов белка позволяет резко расширить возможности структурного и функционального исследования данного белка. Концепция конформационного фингерпринтинга с помощью широкой панели мАт безусловно приложима к изучению разных различных белков.

Когда мы начинали этот проект, отношение к нему было более чем критическим, в частности потому, что подобный подход использовали всего несколько лабораторий в мире. С особым удовлетворением хочу отметить, что к числу этих нескольких лабораторий относилась лаборатория **Г.И. Абелева** (Российский онкологический центр, Москва), где с использованием нового подхода были проанализированы более 50 мАт к альфа-фетопротейну для изучения структуры и функций этого важного онкомаркера [96].

Выражаю искреннюю признательность как ключевым коллегам, упомянутым в этой статье, так и всем сотрудникам/соавторам опубликованных по этой теме статей, без участия которых осуществление данного проекта было бы невозможным.

Этот проект частично поддержан грантом от Министерства образования и науки Российской Федерации (Мега-грант 14.Z50.31.0026 **на базе НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева МЗ РФ**).

Частично работа проведена в рамках государственного задания МГУ им. М.В. Ломоносова.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Köhler G., Milstein C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. **256**, 495–497.
2. <http://www.whatisbiotechnology.org/exhibitions/milstein/patents>
3. Auerbach R., Alby L., Morrissey L.W., et al. (1985) Expression of organ-specific antigens on capillary endothelial cells. *Microvasc. Res.* **29**, 401–411.
4. Allikmets E.Y., Danilov S.M. (1986) Mitogen-induced disorganization of capillary-like structures formed by human large vessel endothelial cells *in vitro*. *Tissue Cell*. **18**, 481–489.
5. Sturrock E.D., Anthony C.S., Danilov S.M. (2012) Peptidyl-dipeptidase A/Angiotensin I-converting enzyme. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 3<sup>rd</sup> Ed. Eds Rawlings N.D., Salvesen G. Oxford: Acad. Press, Ch. **98**, 480–494.
6. Bernstein K.E., Ong F.S., Blackwell W.L., et al. (2013) A modern understanding of the traditional and nontraditional biological functions of Angiotensin-converting enzyme. *Pharmacol. Rev.* **65**, 1–46.
7. Danilov S.M., Franke F.E., Erdos E.G. (1997) Angiotensin-converting enzyme (CD143). In: *Leucocyte Typing VI: White Cell Differentiation Antigens*. Eds Kishimoto T. et al. New York: Garland Publ. Inc., 746–749.
8. Dzau V.J., Bernstein K., Celermajer D., et al. (2001) The relevance of tissue angiotensin-converting enzyme: manifestations in mechanistic and endpoint data. *Am. J. Cardiol.* **88**, 1L–20L.
9. Metzger R., Franke F.F., Bohle R.-M., et al. (2011) Heterogeneous distribution of Angiotensin I-converting enzyme (CD143) in the human and rat vascular systems: vessels, organs and species specificity. *Microvasc. Res.* **82**, 206–215.
10. Silverstein E., Friedland J., Setton C. (1978) Angiotensin-converting enzyme in macrophages and Freund's adjuvant granuloma. *Isr. J. Med. Sci.* **14**, 314–318.
11. Danilov S.M., Sadovnikova E., Scharenbourg N., et al. (2003) Angiotensin-converting enzyme (CD143) is abundantly expressed by dendritic cells and discriminates human monocytes-derived dendritic cells from acute myeloid leukemia-derived dendritic cells. *Exp. Hem.* **31**, 1301–1309.
12. Parkin E.T., Turner A.J., Hooper N.M. (2004) Secretase-mediated cell surface shedding of the angiotensin-converting enzyme. *Protein Pept. Lett.* **11**, 423–432.
13. Alhenc-Gelas F., Richard J., Courbon D., et al. (1991) Distribution of plasma angiotensin I-converting enzyme levels in healthy men: Relationship to environmental and hormonal parameters. *J. Lab. Clin. Med.* **117**, 33–39.
14. Lieberman J. (1975) Elevation of serum angiotensin-converting enzyme level in sarcoidosis. *Am. J. Med.* **59**, 365–372.
15. Lieberman J., Beutler E. (1976) Elevation of angiotensin-converting enzyme in Gaucher's disease. *N. Engl. J. Med.* **294**, 1442–1444.
16. Silverstein E., Friedland J. (1977) Elevated serum and spleen angiotensin converting enzyme and serum lysozyme in Gaucher's disease. *Clin. Chim. Acta.* **74**, 21–25.
17. Rigat B., Hubert C., Alhenc-Gelas F., et al. (1990) An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J. Clin. Invest.* **86**, 1343–1346.
18. Danilov S.M., Savoie F., Lenoir B., et al. (1996) Development of enzyme-linked immunoassays for human angiotensin I-converting enzyme suitable for large-scale studies. *J. Hypertens.* **14**, 719–727.
19. Gribouval O., Gonzales M., Neuhaus T. (2005) Mutations in genes in the renin-angiotensin system are associated with autosomal recessive renal tubular dysgenesis. *Nat. Genet.* **37**, 964–968.
20. Kramers C., Danilov S.M., Deinum J., et al. (2001) A point mutation in the stalk of angiotensin-converting enzyme causes a dramatic increase in serum ACE, but no cardiovascular disease. *Circulation.* **104**, 1236–1240.
21. Danilov S.M., Gordon K., Nesterovitch A.B., et al. (2011) Angiotensin I-converting enzyme mutation (Y465D) cause dramatic increase in blood ACE via accelerated ACE shedding due to changes of ACE dimerization. *PLoS ONE.* **6**, e25952.
22. Nesterovitch A.B., Hogarth K.D., Adarichev V.A., et al. (2009) Point mutation of angiotensin I-converting enzyme (Trp1197Stop) determines a dramatic increase in blood ACE. *PLoS ONE.* **4**, e8282.
23. Persu A., Lambert M., Deinum J., et al. (2013) A novel splice-site mutation in angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene, c.3691+1G>A (IVS25+1G>A), causes a dramatic increase in circulating ACE through deletion of the transmembrane anchor. *PLoS ONE.* **8**, e59537.
24. Soubrier F., Alhenc-Gelas F., Hubert C., et al. (1988) Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 9386–9390.
25. Chen H.-L., Lunsdorf H., Hecht H.-J., Tsai H. (2010) Porcine pulmonary angiotensin I-converting enzyme – Biochemical characterization and spatial arrangement of the N- and C-domains by three-dimensional electron-microscopic reconstruction. *Micron.* **41**, 674–685.
26. Menard J., Patchett A.A. (2001) Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Adv. Protein Chem.* **56**, 13–75.
27. Сахаров И.Ю., Духанина Е.А., Данилов С.М. (1986) Выделение и свойства ангиотензин-превращающего фермента из легких человека. *Биохимия.* **51**, 946–951.

28. Sakharov I.Y., Danilov S.M., Dukhanina E.A. (1987) Affinity chromatography and some properties of the angiotensin-converting enzyme from human heart. *Biochim. Biophys. Acta.* **923**, 143–149.
29. Sakharov I.Y., Danilov S.M., Sukhova N. (1987) Isolation of human liver angiotensin-converting enzyme by chromatofocusing. *Analyt. Biochem.* **116**, 14–17.
30. Danilov S.M., Jaspard E., Churakova T., et al. (1994) Structure-function analysis of angiotensin-converting enzyme using monoclonal antibodies. Selective inhibition of N-domain active center. *J. Biol. Chem.* **269**, 26806–26814.
31. Tzartos S.J. (1988) Myasthenia gravis studied by monoclonal antibodies to acetylcholine receptor. *In Vivo.* **2**, 105–110.
32. Danilov S.M., Allikmets E.Y., Sakharov I.Y., et al. (1987) Monoclonal antibodies to human angiotensin-converting enzyme. *Biotech. Appl. Biochem.* **9**, 319–312.
33. Levinson S.S., Miller J.J. (2002) Towards a better understanding of heterophile (and the like) antibody interference with modern immunoassays. *Clin. Chim. Acta* **325**, 1–15.
34. Balyasnikova I.V., Metzger R., Franke F.E., Danilov S.M. (2003) Monoclonal antibodies to denatured human ACE (CD143): broad species specificity, reactivity on paraffin sections and detection of subtle conformational changes in the C-terminal domain of ACE. *Tissue Antigens.* **61**, 49–62.
35. Balyasnikova I.V., Metzger R., Franke F.E., et al. (2008) Epitope mapping of mAbs to denatured human testicular ACE. *Tissue Antigens.* **72**, 354–368.
36. Naperova I.A., Balyasnikova I.V., Schwartz D.E., et al. (2008) Mapping of conformational mAb epitopes to the C domain of human angiotensin I-converting enzyme (ACE). *J. Proteome Res.* **7**, 3396–3411.
37. Woodman Z.L., Schwager S.L., Redelinguys P., et al. (2005) The N domain of somatic angiotensin-converting enzyme negatively regulates ectodomain shedding and catalytic activity. *Biochem. J.* **389**, 739–744.
38. Balyasnikova I.V., Sun Z-L., Berestetskaya Y.V., et al. (2005a) Monoclonal antibodies 1B3 and 5C8 as probes for monitoring the nativity of C-terminal end of soluble angiotensin-converting enzyme (ACE). *Hybridoma.* **24**, 14–25.
39. Balyasnikova I.V., Skirgello O.E., Binevski P.V., et al. (2007) Monoclonal antibodies 1G12 and 6A12 to the N-domain of human angiotensin-converting enzyme: fine epitope mapping and antibody-based method for revelation and quantification of ACE inhibitors in the human blood. *J. Proteome Res.* **6**, 1580–1594.
40. Skirgello O.E., Balyasnikova I.V., Binevski P.V., et al. (2006) Inhibitory antibodies to human angiotensin-converting enzyme: fine epitope mapping and mechanism of action. *Biochemistry.* **45**, 4831–4847.
41. Danilov S.M., Watermeyer J.M., Balyasnikova I.V., et al. (2007) Fine epitope mapping of monoclonal antibody 5F1 reveals anticatalytic activity toward the N domain of human angiotensin-converting enzyme. *Biochemistry.* **46**, 9019–9031.
42. Gordon K., Balyasnikova I.V., Nesterovitch A.B., et al. (2010) Fine epitope mapping of monoclonal antibodies 9B9 and 3G8, to the N domain of human angiotensin I-converting enzyme (ACE) defines a region involved in regulating ACE dimerization and shedding. *Tissue Antigens.* **75**, 136–150.
43. Balyasnikova I.V., Karran E.H., Albrecht R.F. 2nd, Danilov S.M. (2002) Epitope-specific antibody-induced cleavage of angiotensin-converting enzyme from the cell surface. *Biochem. J.* **362**, 585–595.
44. Kost O.A., Balyasnikova I.V., Chemodanova E.E., et al. (2003) Epitope-dependent blocking of the angiotensin-converting enzyme dimerization by monoclonal antibodies to N-terminal domain of ACE: Possible link of ACE dimerization and shedding from the cell surface. *Biochemistry.* **42**, 6965–6976.
45. Petrov M.N., Shilo V.Y., Tarasov A.V., et al. (2012) Conformational changes of blood ACE in chronic uremia. *PLoS One.* **7**, e49290.
46. Danilov S.M., Deinum J., Balyasnikova I.V., et al. (2005) Detection of mutated angiotensin-converting enzyme (ACE), by serum/plasma analysis using a pair of monoclonal antibodies. *Clin. Chem.* **51**, 1040–1043.
47. Danilov S.M., Kalinin S., Chen Z., et al. (2010a) Gln1069Arg angiotensin I-converting enzyme mutation impairs transport to the cell surface resulting in selective denaturation of the C-domain. *PLoS ONE.* **5**, e10438.
48. Danilov S.M., Wade M.S., Schwager S.L., et al. (2014) A novel angiotensin I-converting enzyme mutation (S333W) impairs N-domain enzymatic cleavage of the anti-fibrotic peptide, Ac-SDKP. *PLoS ONE.* **9**, e88001.
49. Danilov S.M., Luensdorf H., Nesterovitch A.B., et al. (2016) Lysozyme and bilirubin bind to ACE and regulates ACE conformation and shedding. *Sci. Rep.* **6**, 34913.
50. Danilov S.M., Balyasnikova I.B., Danilova A.S., et al. (2010b) Conformational fingerprinting of the angiotensin-converting enzyme (ACE): Application in sarcoidosis. *J. Proteome Res.* **9**, 5782–5793.
51. Balyasnikova I.V., Metzger R., Visintine D., et al. (2005b) A new set of monoclonal antibodies to rat angiotensin I-converting enzyme (ACE) for the lung endothelial targeting. *Pulm. Pharm. Ther.* **18**, 251–267.
52. Balyasnikova I.V., Metzger R., Sun Z-L., et al. (2005c) Development and characterization of rat monoclonal antibodies to denatured mouse angiotensin-converting enzyme. *Tissue Antigens.* **65**, 240–251.
53. Balyasnikova I.V., Sun Z-L., Metzger R., et al. (2006) Monoclonal antibodies to native mouse angiotensin-converting enzyme (CD143): ACE expression quantification, lung endothelial cell targeting and gene delivery. *Tissue Antigens.* **67**, 10–29.
54. Nikolaeva M.A., Balyasnikova I.V., Alexinskaya M.A., et al. (2006) Testicular isoform of angiotensin I-converting enzyme (ACE, CD143) on the surface of human spermatozoa: revelation and quantification

- using monoclonal antibodies. *Am. J. Reprod. Immunol.* **55**, 54–68.
55. Franke F.E., Pauls K., Kerkman L., et al. (2000) Somatic isoform of angiotensin I-converting enzyme in the pathology of testicular germ cell tumors. *Human Pathol.* **31**, 1466–1476.
  56. *Essentials in Glycobiology* (2009). Eds Varki A., Cummings R.D., Esko J.D., et al. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor (N.Y.): Cold Spring Harbor Lab. Press.
  57. Su Y., Royle L., Radcliffe C.M., et al. (2009) Detailed N-glycan analysis of mannose receptor purified from murine spleen indicates tissue specific sialylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **384**, 436–443.
  58. Fishman A. (1963) Dynamics of the pulmonary circulation. in: *Handbook of Physiology.* **2**. Washington DC: Am Physiol Soc., p. 1667.
  59. Silverstein E., Friedland J., Lyons H.A., Gourin A. (1976) Elevation of angiotensin-converting enzyme in granulomatous lymph nodes and serum in sarcoidosis: clinical and possible pathological significance. *Ann. NY Acad. Sci.* **278**, 498–513.
  60. Кост О.А., Петров М.Н., Наперова И.А., и др. (2015) Конформационный фингерпринтинг ангиотензин-превращающего фермента в крови в норме и при развитии патологии. *Вестн. Московского Университета. Сер. 2 (Химия).* 399–404.
  61. Sidransky E. (2012) Gaucher disease: insights from a rare Mendelian disorder. *Discov. Med.* **14**, 273–281.
  62. Kryukova O.V., Tikhomirova V.E., Golukhova E.Z., et al. (2015) Tissue specificity of human angiotensin I-converting enzyme. *PLoS ONE.* **10**, e0143455.
  63. Liddy K.A., White M.Y., Cordwell S.J. (2013) Functional decorations: post-translational modifications and heart disease delineated by targeted proteomics. *Genome Med.* **5**, 20.
  64. Falkenhahn M., Franke F., Bohle R.M., et al. (1995) Cellular distribution of angiotensin converting enzyme after myocardial infarction. *Hypertension.* **25**, 219–226.
  65. Tikhomirova V.E., Kost O.A., Kryukova O.V., et al. (2017) ACE phenotyping in human heart. *PLoS One.* **12**(8), e0181976.
  66. Goette A., Staack T., Rocken C., et al. (2000) Increased expression of extracellular signal-regulated kinase and angiotensin-converting enzyme in human atria during atrial fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* **35**, 1669–1677.
  67. Xiao H.D., Fuchs S., Campbell D.J., et al. (2004) Mice with cardiac-restricted angiotensin-converting enzyme (ACE) have atrial enlargement, cardiac arrhythmia, and sudden death. *Am. J. Pathol.* **165**, 1019–1032.
  68. Romer F.K. (1984) Clinical and biochemical aspects of sarcoidosis. With special reference to angiotensin-converting enzyme (ACE). *Acta Med. Scand. Suppl.* **690**, 3–96.
  69. Hohlbrugger G., Pschorr J., Dahlheim H. (1984) Angiotensin I converting enzyme in the ejaculate of fertile and infertile men. *Fertil. Steril.* **41**, 324–325.
  70. Ferrara N. (2004) Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr. Rev.* **25**, 581–611.
  71. Grivas N., Goussia A., Stefanou D., Giannakis D. (2016) Microvascular density and immunohistochemical expression of VEGF, VEGFR-1 and VEGFR-2 in benign prostatic hyperplasia, high-grade prostate intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Cent. Eur. J. Urol.* **69**, 63–71.
  72. Roberts W.G., Palade G.E. (1995) Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J. Cell Sci.* **108** (pt 6), 2369–2379.
  73. Hiemisch H., Gavrilyuk V., Atochina E., et al. (1993) Purification of radiolabeled monoclonal antibodies to angiotensin-converting enzyme significantly improves specificity and efficacy of its targeting into the lung. *Nucl. Med. Biol.* **20**, 435–441.
  74. Danilov S.M., Sakharov I.Y., Martynov A.V., et al. (1989) Monoclonal antibody to angiotensin-converting enzyme: a powerful tool for lung and vessel studies. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **21** (Suppl.1), 165–170.
  75. Danilov S.M., Muzykantov V.R., Martynov A.V., et al. (1991) Lung is the target organ for a monoclonal antibody to angiotensin-converting enzyme. *Lab. Invest.* **64**, 118–124.
  76. Danilov S.M., Gavrilyuk V.D., Franke F.E., et al. (2001) Lung uptake of antibodies to endothelial antigens: key determinants of vascular immunotargeting. *Am. J. Physiol. Lung Physiol.* **280**, L1335–L1347.
  77. Muzykantov V.R. (2005) Biomedical aspects of targeted delivery of drugs to pulmonary endothelium. *Expert Opin. Drug Deliv.* **5**, 909–926.
  78. Chrastina A., Valadon P., Massey K.A., Schnitzer J.E. (2010) Lung vascular targeting using antibody to aminopeptidase P: CT-SPECT imaging, biodistribution and pharmacokinetic analysis. *J. Vasc. Res.* **47**, 531–543.
  79. Somia N., Verma I.M. (2000) Gene therapy: trials and tribulations. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 91–99.
  80. Reynolds P.N., Zinn K.R., Gavrilyuk V.D., et al. (2000) A targetable, injectable adenoviral vector for selective gene delivery to pulmonary endothelium *in vivo*. *Mol. Ther.* **2**, 562–578.
  81. Muzykantov V.R., Barnathan E., Atochina E., Fisher A. (1996) Targeting of conjugated plasminogen activators to the pulmonary vasculature. *J. Pharm. Exp. Ther.* **279**, 1026–1034.
  82. Muzykantov V.R., Atochina E.N., Ischiropoulos H., et al. (1996) Immunotargeting of antioxidant enzymes to the pulmonary endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 5213–5218.
  83. Atochina E.N., Balyasnikova I.V., Danilov S.M., et al. (1998) Catalasetargeting to the surface endothelial antigens protects pulmonary vasculature against oxidative insult. *Am. J. Physiol. Lung Physiol.* **275**, L806–L817.
  84. Nowak K., Weih S., Metzger R., et al. (2007) Immunotargeting of catalase to lung endothelium via

- anti-ACE antibodies attenuates ischemia-reperfusion injury of the lung *in vivo*. *Am. J. Physiol. Lung Physiol.* **293**, L162–L169.
85. Nowak K., Hanusch C., Nicksch K., et al. (2010) Pre-ischemic conditioning of the pulmonary endothelium by immunotargeting of catalase via angiotensin-converting enzyme antibodies. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **37**, 859–863.
86. Reynolds P.N., Nicklin S.A., Kaliberova L., et al. (2001) Combined transductional and transcriptional targeting improves the specificity of transgene expression *in vivo*. *Nat. Biotechnol.* **19**, 838–842.
87. Miller W.H., Brosnan M.J., Graham D., et al. (2005) Targeting endothelial cells with adenovirus expressing nitric oxide synthase prevent elevation of blood pressure in stroke prone spontaneously hypertensive rats. *Mol. Ther.* **12**, 321–327.
88. Reynolds A.M., Xia M., Holmes M.D., et al. (2007) Bone morphogenetic protein type 2 receptor (BMPR2) gene therapy attenuates hypoxic pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Physiol.* **292**, L1182–L1192.
89. Reynolds A.M., Holmes M.D., Danilov S.M., Reynolds P.N. et al. (2012) Targeted delivery of bone morpho-genetic protein receptor type-2 attenuates pulmonary hypertension in rats. *Eur. Resp. J.* **39**, 329–343.
90. Morecroft I., White K., Caruso P., et al. (2012) Gene therapy by targeted adenovirus-mediated knockdown of pulmonary endothelial Tph1 attenuates hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Mol. Ther.* **20**, 1516–1528.
91. United Network for Organ Sharing Scientific Registry Data. ([www.unos.org](http://www.unos.org))
92. Chiu M.L., Gilliland G.L. (2016) Engineering antibody therapeutics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **38**, 163–173.
93. Balyasnikova I.V., Berestetskaya Y.V., Visintine D.J., et al. (2010) Cloning and characterization of a single-chain fragment of monoclonal antibody 9B9 for targeting angiotensin-converting enzyme. *Microvasc. Res.* **80**, 355–364.
94. Bruggemann M., Osborn M.J., Ma B., et al. (2015) Human antibody production in transgenic animals. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* **63**, 101–108.
95. Paduch M., Koide A., Uysal S., et al. (2013) Generating conformation-specific synthetic antibodies to trap proteins in selected functional states. *Methods.* **60**, 3–14.
96. Yakimenko E.F., Yazova A.K., Goussev A.I., Abelev G.I. (2003) New approaches for the detection and characterization of alpha-fetoprotein epitope variants. *Tumour Biol.* **24**, 1–8.

## Conformational Fingerprinting Using Monoclonal Antibodies (On the Example of Angiotensin I-Converting Enzyme-ACE)

S. M. Danilov<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>University of Illinois at Chicago; University of Arizona Health Sciences, Tucson, USA

<sup>2</sup>Medical Science and Education Center of Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

\*e-mail: [danilov@uic.edu](mailto:danilov@uic.edu)

During the past 30 years my laboratory has generated 40 + monoclonal antibodies (mAbs) directed to structural and conformational epitopes on human ACE as well as ACE from rats, mice and other species. These mAbs were successfully used for detection and quantification of ACE by ELISA, Western blotting, flow cytometry and immunohistochemistry. In all these applications mainly single mAbs were used. We hypothesized that we can obtain a completely new kind of **new** information about ACE structure and function if we use the **whole set** of mAbs directed to **different** epitopes on the ACE molecule. When we finished epitope mapping of all mAbs to ACE (and especially, those recognizing conformational epitopes), we realized that we had obtained a new tool to study **ACE**. First, we demonstrated that binding of some mAbs is very sensitive to local conformational changes on the ACE surface – due to local denaturation, inactivation, ACE inhibitor or mAbs binding or due to diseases. Second, we were able to detect, localize and characterize several human ACE mutations. And, finally, we established a new concept – **conformational fingerprinting of ACE** using mAbs that in turn allowed us to obtain evidence for **tissue specificity of ACE**, which has promising scientific and diagnostic perspectives. The initial goal for the generation of mAbs to ACE 30 years ago was obtaining mAbs to organ-specific endothelial cells, which could be used for organ-specific drug delivery. Our systematic work on characterization of mAbs to numerous epitopes on ACE during these years has led not only to the generation of the most effective mAbs for specific drug/gene delivery into the **lung** capillaries, but also to the establishment of the concept of **conformational fingerprinting of ACE**, which in turn gives a theoretical base for the generation of mAbs, specific for ACE from different organs. We believe that this concept could be applicable for any glycoprotein against which there is a set of mAbs to different epitopes.

**Keywords:** Angiotensin I-converting enzyme, monoclonal antibodies, conformation, tissue specificity, drug/gene lung targeting