

НОВЫЕ ОДНОДОМЕННЫЕ АНТИТЕЛА К МЕЗОТЕЛИНУ И КЛЕТОЧНЫЕ МОДЕЛИ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Ю. Е. Кравченко, С. П. Чумаков [✉], Е. И. Фролова

Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва, Россия

Среди случаев трижды негативного рака молочной железы (ТНПМЖ) преобладают новообразования с повышенной экспрессией поверхностного антигена мезотелина (MSLN) — одной из предпочтительных мишеней для направленной терапии многих видов солидных опухолей. Разработка MSLN-опосредованной терапии ТНПМЖ осложнена тем, что большая часть перевиваемых клеточных культур этого субтипа MSLN-негативны. Целью работы было найти гиперэкспрессирующие MSLN модельные клеточные культуры ТНПМЖ и получить новые однодоменные антитела (наноантитела), распознающие MSLN на клетках ТНПМЖ. Уровни транскрипта мезотелина были определены на панели клеточных линий ТНПМЖ при помощи ОТ-ПЦР-РВ, результаты верифицированы непрямым иммуно-ферментным анализом на мегакариоцит-потенцирующий фактор, секретруемую часть белка-предшественника мезотелина. Для получения наноантител адаптировали метод предварительного обогащения иммунных библиотек фрагментов VHH-антител из мононуклеаров *Vicugna pacos* с селекцией при помощи фагового дисплея. В результате исследования получены два варианта наноантител, обладающих высокой специфичностью взаимодействия с мишенью и K_d около 140 и 95 нмоль. Были идентифицированы две линии клеток MSLN⁺ и три линии MSLN⁻ ТНПМЖ. Наноантитела оказались способны распознавать целевой антиген на MSLN⁺ клетках и обладали низким уровнем связывания с MSLN⁻ клеточными культурами. Установлена удобная клеточная модель MSLN⁺ ТНПМЖ для тестирования MSLN-опосредованной терапии; новые однодоменные антитела могут быть использованы в качестве нацеливающих частей химерных антигенных рецепторов.

Ключевые слова: наноантитела, химерный антигенный рецептор, мезотелин, трижды негативный рак молочной железы

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (уникальный код проекта RFMEFI60418X0205).

Вклад авторов: Ю. Е. Кравченко — работа с клеточными культурами, ПЦР-РВ, ИФА; С. П. Чумаков — получение иммунных библиотек, проведение селекции, очистка белковых препаратов, цитометрия, написание рукописи; Е. И. Фролова — планирование исследования, проведение манипуляций с животными, работа с первичными культурами, редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: работу с животными проводили в соответствии с принципами и требованиями Международной лаборатории по уходу за животными и Директивой совета европейских сообществ (86/609/ЕЕС) от 24 ноября 1986 г.

✉ **Для корреспонденции:** Степан Петрович Чумаков
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, г. Москва, 117997; hathkul@gmail.com

Статья получена: 28.09.2020 **Статья принята к печати:** 20.10.2020 **Опубликована онлайн:** 30.10.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.068

NEW ANTI-MESOTHELIN SINGLE-DOMAIN ANTIBODIES AND CELL MODELS FOR DEVELOPING TARGETED BREAST CANCER THERAPY

Kravchenko YuE, Chumakov SP [✉], Frolova EI

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Most triple negative breast cancers (TNBC) are characterized by elevated expression of mesothelin (MSLN), a cell surface antigen and one of the preferred targets for the therapy of solid tumors. Most continuous TNBC cell lines are MSLN-negative, which obstructs the development of MSLN-targeted therapy for TNBC. The aim of this study was to identify TNBC cell lines with MSLN hyperexpression and to obtain single-domain antibodies (nanobodies) capable of recognizing MSLN in TNBC cells. Mesothelin expression levels were measured in the panel of TNBC cell lines by real-time reverse-transcription PCR. PCR results were verified by measuring concentrations of the megakaryocyte potentiating factor (the secreted fragment of the mesothelin precursor) using sandwich ELISA. Immune phage-display VHH fragment libraries were prepared from mononuclear cells of *Vicugna pacos* using a modified library enrichment protocol. Two nanobody variants with high specificity for the target and K_d of about 140 and 95 nmol, respectively were obtained. Two MSLN⁺ and three MSLN⁻ cell lines were identified in the TNBC cell lines panel. The nanobodies demonstrated the ability to recognize the target antigen in MSLN⁺ cells and had the low ability to bind to MSLN⁻ cells. Thus, we found a convenient MSLN⁺ TNBC cell model for MSLN-targeted therapy testing. The new single-domain antibodies can be used as targeting components of chimeric antigen receptors.

Keywords: nanobody, chimeric antigen receptor, mesothelin, triple-negative breast cancer

Funding: the study was supported by the Russian Ministry of Education and Science (Project ID RFMEFI60418X0205).

Author contribution: Kravchenko JE — cell culture, real-time PCR and ELISA; Chumakov SP — preparation of immune libraries, protein purification, flow cytometry, manuscript preparation; Frolova EI — study design, immunization and blood collection, primary cultures, manuscript preparation.

Compliance with ethical standards: the study was conducted in compliance with the guidelines of the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International and the Directive 86/609/EEC dated November 24, 1986.

✉ **Correspondence should be addressed:** Stepan P. Chumakov
Miklouho-Maclaya, 16/10, Moscow, 117997; hathkul@gmail.com

Received: 28.09.2020 **Accepted:** 20.10.2020 **Published online:** 30.10.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.068

Мезотелин (mesothelin, MSLN) — небольшой поверхностный белок, закрепленный на клеточной мембране при помощи С-концевого гликозилфосфатидилинозитола (ГФИ-якоря) [1]. В организме человека экспрессия мезотелина ограничена клетками выстилки перикарда, брюшины и плевральной полости, однако многие типы опухолей

(100% мезотелиом, до 70% рака яичников, 60% ТНПМЖ, 50% рака легкого, опухоли поджелудочной железы и желчевыводящих путей, рак желудка) характеризуются высоким содержанием мезотелина на поверхности клеток [2, 3]. Биологическая роль мезотелина в развитии злокачественного новообразования понятна не до конца.

Мезотелин выступает в качестве рецептора для другого опухолевого антигена, MUC16, что может стимулировать интраперитонеальную метастатическую экспансию MUC16-экспрессирующих клеток, которая характерна для опухолей яичника [4]. Мезотелин может подавлять TNF α -индуцированный апоптоз опухолевых клеток [5], стимулировать пролиферацию, опухолевую инвазию [6] и резистентность к химиотерапии [7]. Явное проонкогенное влияние этого белка, его усиленная продукция в наиболее злокачественных субпопуляциях опухолевых клеток и ограниченная экспрессия в нормальных тканях делают мезотелин одной из наиболее предпочтительных мишеней для направленной терапии опухолей моноклональными антителами и иммунными клетками, экспрессирующими химерные антигенные рецепторы (ХАР). Уже проходят испытания нескольких вариантов иммунотоксинов и MSLN-CAR-T для терапии мезотелиом, протоковых раков поджелудочной железы, желчевыводящих путей, желудка и яичников [3].

Мезотелин может выступать в качестве маркера для большей части ТНРМЖ [8]. Этот условный субтип РМЖ определяют как не имеющий повышенных уровней экспрессии эстрогенового рецептора (ЭР), прогестеронового рецептора (ПР) и рецептора HER2/neu (ERBB2). ТНРМЖ характеризуется высокой злокачественностью и наиболее неблагоприятным прогнозом, что связано с отсутствием эффективных терапевтических схем. Были предприняты попытки разделить этот субтип по экспрессионным паттернам: недавно из ТНРМЖ выделен клаудин-дефицитный подтип [9], однако это пока не привело к появлению средств специфической терапии. Мезотелин, который гиперэкспрессирован у более половины ТНРМЖ и у не более 4% ER⁺, PR⁺ и ERBB⁺ опухолей молочной железы, мог бы выступать и в качестве достаточно селективного маркера ТНРМЖ, и в качестве перспективной терапевтической мишени [10].

В MSLN-направленной терапии при помощи препаратов клеток, несущих ХАР, используют последовательности известных моноклональных антител к MSLN, переведенных в одноцепочечный формат (scFv) [11]. Такой подход позволяет быстро получить прототипные варианты структур ХАР и испытать их эффективность, однако у него имеются и недостатки. Полученные из традиционных антител scFv могут иметь ухудшенные физико-химические свойства за счет нарушенной вторичной структуры и сниженную степень сродства к мишени либо специфичность связывания [12]. Кроме того, при отборе моноклональных антител для иммунотерапии и иммунодиагностики оптимальными считают варианты, обладающие высокой (десятки наномоль и меньше) аффинностью. Для ХАР же показано, что наиболее значимым является специфичность связывания антигена, при этом оптимальная степень сродства к мишени может быть существенно ниже [13]. Такие различия приводят к необходимости поиска новых вариантов антител для использования в составе ХАР.

Применение антител в виде scFv для ХАР-опосредованной терапии дает дополнительные преимущества альтернативным структурам иммуноглобулинов, в частности, однодоменным антителам (sdAb) верблюдовых [14]. Антитела, состоящие из гомодимеров особых укороченных тяжелых цепей (V_H, variable heavy-heavy), возникли у животных семейства вследствие точечной мутации в шарнирной области тяжелой цепи, и в ходе эволюции адаптировались для эффективного распознавания антигенов без участия

вариабельных фрагментов легких цепей [15]. За счет большей протяженности CDR3 и наличия дополнительной дисульфидной связи, V_HH-антитела обладают способностью связываться с мишенями с аффинностью и специфичностью, аналогичными антителам традиционной структуры, при этом обладают меньшим размером и хорошей растворимостью. Локализация распознающих антигены участков на единственной пептидной цепи максимально упрощает применение V_HH-антител в виде scFv (V_HH-фрагментов, или наноантител), что особенно востребовано при создании новых вариантов ХАР [16]. Уже известны два варианта V_HH-антител к мезотелину, однако их использование пока ограничено иммунодиагностикой [17, 18].

Для использования анти-MSLN ХАР в терапии ТНРМЖ необходимы создание и испытание антигенраспознающих фрагментов к MSLN, а также поиск оптимальной модели для испытания таких ХАР *ex vivo*. Согласно данным литературы, среди клеточных линий ТНРМЖ наиболее распространены MSLN⁺. Целью работы было провести скрининг панели коммерчески доступных линий ТНРМЖ для поиска модельной культуры, характеризующейся высоким уровнем MSLN, провести селекцию V_HH-антител к MSLN методом фагового дисплея и идентифицировать несколько вариантов последовательностей, которые могут быть использованы для создания анти-MSLN ХАР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток

Использованные в работе линии клеток НЕК-293Т (культура человеческих трансформированных клеток) и MDA-MB-231, MDA-MB-468, MDA-MB-436, MDA-MB-157, MDA-MB-453, HCC1937, HCC1143, HCC38, HCC70, HCC1806, HCC1187, HCC1395, BT-549, BT-20 и Hs 578Т (ТНРМЖ) были получены из Американской коллекции типовых клеточных культур (ATCC; США). Их культивировали в среде DMEM-F12 (PAA; Австрия) с добавлением 10%-й эмбриональной сыворотки телят (Gibco; США), 2 мМ аланилглутамин (ПанЭко; Россия), 20 мМ HEPES и по 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина («ПанЭко»; Россия).

Выделение РНК и постановка обратной транскрипции

Выделение РНК проводили на колонках с использованием набора RNeasy Mini kit (Qiagen; США) по протоколу производителя либо в препаративных количествах с применением реагента ExtractRNA («Евроген»; Россия) в соответствии с протоколом производителя. Очищенную РНК использовали для синтеза обратной цепи кДНК при помощи ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB; США). На реакцию брали 500 нг РНК, смешивали с компонентами набора по протоколу производителя с использованием праймера d(T)₂₃; для получения кДНК V_HH-фрагментов использовали специфичный праймер CH2-IgG-sp rev (GGTACGTGCTGTTGAAGTGTCC), инкубировали смесь в течение часа при 42 °С, затем при 80 °С в течение 5 мин. Для количественной ПЦР (кПЦР) использовали не более 50 нг кДНК для реакции.

ПЦР в реальном времени

кПЦР проводили с использованием полимеразы HS-Taq («Евроген»; Россия) и набора специфичных праймеров MSLN-qPCR dir (GCACTCCTCTTTCTGCCTGG), MSLN-

qPCR rev (GCCATGGTCTGTGTAGATCCC) и MSLN-probe (5'-FAM-CCCACGGTGCCTCCCTCCCT-BHQ1-3') («ДНК-синтез»; Россия). Подбор праймеров и проб осуществляли с использованием Primer-BLAST (NIH NCBI; США). Анализ праймеров на образование вторичных структур производили при помощи OligoAnalyzer Tool (IDT; США). Все эксперименты проводили в шести независимых повторностях. Сравнение представленности в образцах целевых транскриптов проводили с использованием порогового метода анализа накопления ДНК, предполагающего определение порогового цикла реакции Ct. Для внутреннего контроля процедуры ПЦР-РВ использовали уровень экспрессии *GAPDH*, относительно которого нормализовали показатели экспрессии целевых генов (ΔCt). В качестве калибровочного образца, относительно которого определяли изменение уровней экспрессии анализируемых генов, использовали значение ΔCt в пробе с кДНК, выделенной из клеточной культуры MDA-MB-231. Таким образом, финальный расчет изменений уровней экспрессии генов в исследуемых образцах производили по формуле $2^{-\Delta Ct(\text{образца} - \Delta Ct(\text{калиб}))}$ [19]. Постановку ПЦР производили в приборе MyiQ Single-Color Real-Time PCR Detection System (Bio-rad; США).

Получение продуцента MSLN и наработка рекомбинантного белка

кДНК, приготовленную из клеток линии HCC1806, использовали для постановки ПЦР с праймерами на последовательность мембрано-заякоренной части мезотелина MSLN full dir (GAAGTGGAG AAGACAGCCTGTCTTCAGGC) и MSLN full rev (GCTGAGGTCTAGGACCAGGTAGCCGTTG) («ДНК-синтез»; Россия) с предпрогревом 95 °C — 120 с, затем 30 циклов (95 °C — 30 с, 66 °C — 30 с, 72 °C — 60 с) с использованием полимеразы Tersus («Евроген»; Россия). Потом реакцию смесь электрофоретически разделили в 1%-м агарозном геле с окрашиванием интеркалирующим красителем Sybr Gold (Thermo; США), полосу, соответствующую размеру целевого продукта (~890 п.н.), выделили из геля при помощи набора Cleanup mini («Евроген»; Россия). Полученную ДНК подвергли ПЦР с праймерами MSLN Xba dir (AGAGAGTCTA GAGAAGTGGAGAAGACAGCCTGTCTTCAGGC) и MSLN BglII rev (AGAGAGAGATCTGCTGAGGTCTAGGACCAGGTAGCCG TTG) по указанной выше программе (18 циклов). Продукт ПЦР повторно очищали при помощи набора Cleanup mini и клонировали по сайтам рестрикции XbaI — BglII/BamHI (ферменты, NEB; США) в лентивирусный экспрессионный вектор pLCMV-HT-puro (лигаза T4, «Евроген»; Россия). Плазмидную ДНК pLCMV-MSLN-HT-puro очищали при помощи набора Plasmid miniprep («Евроген»; Россия). Для приготовления препарата лентивируса клетки HEK-293T рассаживали на чашку диаметром 10 см в количестве 106 клеток. На следующий день плазмиду pLCMV-MSLN-HT-puro смешивали с упаковывающими плазмидами psPAX2 и pMD2.G (обе плазмиды были любезно предоставлены Дидьером Троне (Addgene plasmid # 12260; <http://n2t.net/addgene:12260>; RRID:Addgene_12260 и Addgene plasmid # 12259; <http://n2t.net/addgene:12259>; RRID:Addgene_12259) в весовом соотношении 5 : 3 : 2 в суммарном количестве 20 мкг. Трансфекцию проводили по протоколу, адаптированному из опубликованной ранее работы [20] в среде Opti-MEM (Gibco; США). На следующий день среду меняли на бессывороточную DMEM-F12 с добавлением Serum replacement solution и Lipid mixture

(Peprotech; США) и 4 мМ кофеина (Sigma Aldrich; США). Через 48 ч обогащенную вирусом среду собирали, фильтровали и добавляли с 10 мкг/мл полибрана (Sigma Aldrich; США) к свежим клеткам HEK-293T, высаженным чашку диаметром 10 см в количестве 5×10^5 . После суток инкубации среду заменяли на обычную. Через 72 ч после заражения в среду добавляли 1 мкг/мл пурамицина (Sigma Aldrich; США) и продолжали культивировать в течение 10 дней. Для наработки рекомбинантного мезотелина клетки рассаживали в количестве $2,5 \times 10^7$ на шесть чашек диаметром 15 см со средой DMEM-F12 с добавлением Serum replacement solution и Lipid mixture, белоксодержащие культуральные жидкости собирали каждые четыре дня в течение 16 дней. Очистку рекомбинантного мезотелина проводили с использованием HIS Mag Sepharose Excel (Cytiva; США) по протоколу производителя. Объединенные образцы мезотелина затем переводили в фосфатно-солевой буфер при помощи колонок PD-10 (Cytiva; США). Концентрацию белка определяли путем измерения OD280 на Nanodrop OneC (Thermo; США), контроль качества препарата мезотелина проводили при помощи электрофореза в полиакриламидном геле и окрашивания Coomassie Blue G-250 по стандартному протоколу.

Иммунизация животного и получение генетического материала

Источником биологического материала (венозной крови) было животное альпака (*Vicugna pacos*) семейства верблюдовых. Для проведения первичной иммунизации использовали препарат мезотелина в количестве 400 мкг и объеме 500 мкл, смешиваемый с равным объемом полного адьюванта Фрейнда (Pierce; США) до получения гомогенной суспензии. Для проведения бустирований использовали по 250 мкг мезотелина в объеме 500 мкл в смеси с равным количеством неполного адьюванта Фрейнда. Всего было проведено три бустирования с интервалом в две недели; антиген вводили подкожно и внутримышечно в бедро животного. Одновременно с каждой иммунизацией забирали образец венозной крови объемом 10 мл для определения сывороточной концентрации антител к мезотелину. Получение материала В-клеток проводили через пять дней после последнего бустирования, фракция мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) была получена из 100 мл свежесобранной крови альпаки с помощью центрифугирования с раствором фиколла плотностью 1,077 («ПанЭко»; Россия) согласно стандартному протоколу.

Проведение предварительного отбора В-лимфоцитов

Препарат рекомбинантного мезотелина биотинилировали NHS-LC-biotin (Covachem; США) согласно стандартному протоколу. Биотинилированный мезотелин использовали для магнитной сепарации В-лимфоцитов при помощи EasySep Biotin Positive Selection Kit II (Stemcell technologies; Канада) согласно протоколу производителя. Для выделения РНК из селектированной фракции клеток использовали соосадитель Satellite red («Евроген»; Россия).

Сборка иммунной библиотеки VHH-фрагментов

Для приготовления библиотеки использовали кДНК, полученную в восьми независимых реакциях суммарно с 4 мкг мРНК. Амплификацию целевых последовательностей

VНН проводили с использованием высокоточной полимеразы Tersus («Евроген»; Россия) и праймеров AlpVНН3 uni fwd (CCACCATGTCTAGASAGKTGCAGSTSGT RGAGTCTGKGGGAGG), AlpVНН-R1 (AATCCGGATCCGG GGGGTCTTCGCTGTGGTGCG) и AlpVНН-R2 (AATCCGG ATCCGGTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG) (последние два основаны на последовательностях, опубликованных в [21]) по программе 95 °C — 30 с, 61 °C — 30 с, 72 °C — 30 с (30 циклов). Фагмидную библиотеку получали при помощи клонирования амплифицированных последовательностей VНН в фагмиду pHEN2-XB с использованием эндонуклеаз XbaI и BamHI-HF, и T4 electro Ligase (NEB; США). Трансформации подвергали клетки штамма TG-1 при помощи электропоратора Genepulser (Bio-Rad; США). Селекцию проводили согласно опубликованному ранее протоколу [22] с использованием антигена, иммобилизованного на иммунологических пробирках.

Экспрессия и очистка биотинилированных вариантов кандидатных наноантител

Последовательности VНН-фрагментов из препаратов фагмид, полученных из индивидуальных клонов после селекции, клонировали по сайтам XbaI и BamHI в экспрессионный вектор pET-BAD. Полученные конструкции трансформировали в клетки штамма BL21DE3-BirA, экспрессирующие биотинлигазу. Индивидуальные колонии использовали для получения растворимого белка в жидкой среде в соответствии с описанным ранее протоколом [23] с добавлением в среду для культивации 0,2 мМ D-биотина (Covachem; США). Растворимые наноантитела выделяли из периплазмы путем лизиса осажденных бактерий в буфере, состоящем из 50 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 150 мМ NaCl, 0,1% Triton X-100 и 10 мг/мл лизоцима с добавлением PMSF, трехкратной обработкой на ультразвуковом дезинтеграторе Soniprep-100 (Soniprep; США) с последующей очисткой на HIS Mag Sepharose Excel (Cytiva; США) и переводом в фосфатно-солевой буфер.

Иммуноферментный анализ

Оценку содержания секретируемого мегакариоцит-потенцирующего фактора (MPF) в культуральных жидкостях проводили при помощи Human Mesothelin Propeptide/MPF DuoSet (RND Systems; США) согласно протоколу производителя. Для измерения сывороточных антител образцы сыворотки добавляли в лунки планшета, покрытые мезотелином в концентрации 5 мкг/мл, затем обрабатывали поликлональными антиальпачьими антителами овцы, детекцию производили при помощи антиовечьих антител осла, меченых пероксидазой хрена (Santa Cruz; США). Оценку обогащения библиотек в ходе селекции производили в соответствии с опубликованным ранее протоколом [22]. Лунки планшета обрабатывали препаратом мезотелина (5 мкг/мл), детекцию производили с использованием меченых пероксидазой хрена антител к фагу M13 (Sino Biological; Китай). При проведении прямого ИФА с наноантителами планшет также покрывали мезотелином и обрабатывали наноантителами в концентрации 1 мкг/мл. Детекцию проводили с использованием биотинилированных антител к эпитопу Мус («СайсторЛаб»; Россия) и стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена (R&D Systems; США), либо, для биотинилированных наноантител, напрямую с HRP-конъюгированным стрептавидином.

Непрямой ИФА с наноантителами проводили, сорбируя лунки планшета MesoVНН-1ЕЗ в концентрации 5 мкг/мл и детектируя сигнал MesoVНН-2Н5В в концентрации 1 мкг/мл с последующей обработкой HRP-конъюгированным стрептавидином. В качестве субстрата для детекции использовали готовый раствор тетраметилбензидина (Sigma Aldrich; США), колориметрические измерения проводили при помощи микропланшетного сканера Triad (Dynex; США).

Биослойная интерферометрия

Для определения Kd наноантител использовали очищенные препараты MesoVНН-1ЕЗВ и MesoVНН-2Н5В и препарат мезотелина. Определение проводили при помощи биосенсоров Streptavidin (SA) и прибора BLItz (ForteBio; США).

Мечение клеточных культур наноантителами и проточная цитометрия

Адгерентные клетки открепляли раствором TrypLE (Thermo; США), после чего фиксировали 3,7%-м раствором параформальдегида. Суспензии клеток в фосфатно-солевом буфере инкубировали с добавлением наноантител в концентрации 5 мкг/мл в течение часа (кроме контрольных образцов), после чего отмывали и обрабатывали раствором Streptavidin-FITC (MyBioSource; США) в течение 40 мин. Затем удаляли несвязавшийся реагент и измеряли флуоресцентный сигнал при помощи проточного цитометра FACS Vantage SE (Beckton Dickinson; США). Для обработки результатов использовали Flowing Software (Perttu Terho; Финляндия).

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с помощью пакета статистических программ Prism 8 (GraphPad Software; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Иммунизацию и последующее получение наноантител к мезотелину проводили на животном виде *Vicugna pacos*. Рекombинантный мезотелин, использованный для иммунизации, содержал полноразмерные регионы II и III, т. е. основные иммуногены при получении антител к этому белку. В ходе иммунизации и последующего бустирования контролировали развитие иммунного ответа. Рост уровней сывороточных антител к мезотелину между бустированиями № 2 и № 3 замедлился (рис. 1А), поэтому забор материала для приготовления иммунных библиотек был проведен на 5-й день после бустирования № 3. Мононуклеарная фракция клеток крови животного была разделена на две равные части и использована для приготовления двух иммунных фаговых библиотек. Для приготовления первой библиотеки использовали тотальную РНК, выделенную из мононуклеаров, вторая же библиотека была приготовлена из тотальной РНК, выделенной из клеток, прошедших предварительную позитивную иммуномагнитную сепарацию на микросферах, покрытых биотинилированным мезотелином. Такая предселекция была применена для удаления из клеточной популяции В-лимфоцитов, секретирующих нерелевантные антитела. Обе фаговые библиотеки подвергли трем раундам селекции на иммобилизованном антигене

с контролем обогащения между раундами. Пред-селектированную библиотеку характеризовали большое исходное присутствие MSLN-реактивных клонов и более интенсивное обогащение целевыми последовательностями уже после одного раунда селекции (рис. 1Б). По окончании отбора был проведен скрининг 48 случайно отобранных клонов из каждой библиотеки методом ИФА, и варианты, характеризовавшиеся максимальными уровнями сигнала на MSLN (рис. 1В), были отсекужены.

Результаты секвенирования показали, что все отобранные клоны содержат два вида последовательностей VHH-фрагментов, названные MesoVHH-1E3 и MesoVHH-2H5.

Оба отобранных варианта последовательностей были клонированы в экспрессионный вектор рЕТ-BAD для экспрессии в растворимом виде слитно с сигнальным доменом для биотинилирования биотинлигазой BirA. Очищенные при помощи аффинной хроматографии биотинилированные MesoVHH-1E3В и MesoVHH-2H5В были протестированы методом ИФА, что подтвердило сохранение их способности связываться с мезотелином. Был также поставлен непрямой ИФА с использованием MesoVHH-1E3 в качестве захватывающего, а MesoVHH-2H5В в качестве детектирующего антител, таким методом удалось детектировать присутствие образцов мезотелина. Затем препараты VHH-фрагментов были использованы для определения их константы диссоциации методом биопленочной интерферометрии. Для MesoVHH-1E3В Kd составила около 140 нмоль, а для MesoVHH-2H5В — около 95 нмоль.

Уровни экспрессии мезотелина были оценены методом ПЦР-РВ на панели клеточных линий ТНРМЖ для определения культур MSLN⁺ и MSLN⁻. Данные ПЦР-РВ нормализованы относительно клеточной линии MDA-MB-231, для которой характерна невысокая экспрессия мезотелина. Результаты свидетельствуют, что для большей части протестированных линий ТНРМЖ

характерны незначительные уровни транскрипта мезотелина (рис. 2). Две клеточные линии HCC70 и HCC1806 продемонстрировали умеренную и высокую гиперэкспрессию MSLN и были выбраны в качестве модельных для тестирования связывания отобранных анти-MSLN VHH-фрагментов. Клеточные линии HCC1187, Hs 578Т и MDA-MB-453, напротив, имели значительно (>10 раз) сниженный уровень MSLN и были выбраны в качестве отрицательного контроля. Уровни внутриклеточного транскрипта не всегда коррелируют с фактическим количеством белка на поверхности клетки, поэтому результаты ПЦР-РВ были дополнительно верифицированы при помощи ИФА на секретируемый фрагмент белка-предшественника мезотелина, MPF. Наличие MPF в культуральных жидкостях после 6 дней инкубации было зарегистрировано только для HCC70 и HCC1806 (рис. 2Б), причем зарегистрированные уровни MPF хорошо соотносились с данными ПЦР-РВ по экспрессии мезотелина.

Очищенные препараты MesoVHH-1E3В и MesoVHH-2H5В были использованы для мечения клеток отобранных культур и их последующего анализа на проточном цитометре. Использование обоих VHH-фрагментов привело к интенсивному окрашиванию большей части (%) клеточных популяций HCC1806 и HCC70 (рис. 3), при этом окрашивание HCC70 был заметно менее интенсивным. Для культур MDA-MB-453, HCC1187 и Hs 578Т, выступавших в качестве отрицательного контроля для проверки неспецифичного связывания наноантител, ни в одном случае не было зафиксировано значимых отклонений в гистограммах по сравнению с парными образцами, не обработанными VHH-фрагментами. Полученные результаты согласуются с данными ПЦР-РВ по уровням экспрессии мезотелина на использованных для тестирования VHH-фрагментов линиях ТНРМЖ, что свидетельствует об их высокой специфичности связывания наноантител с мишенью.

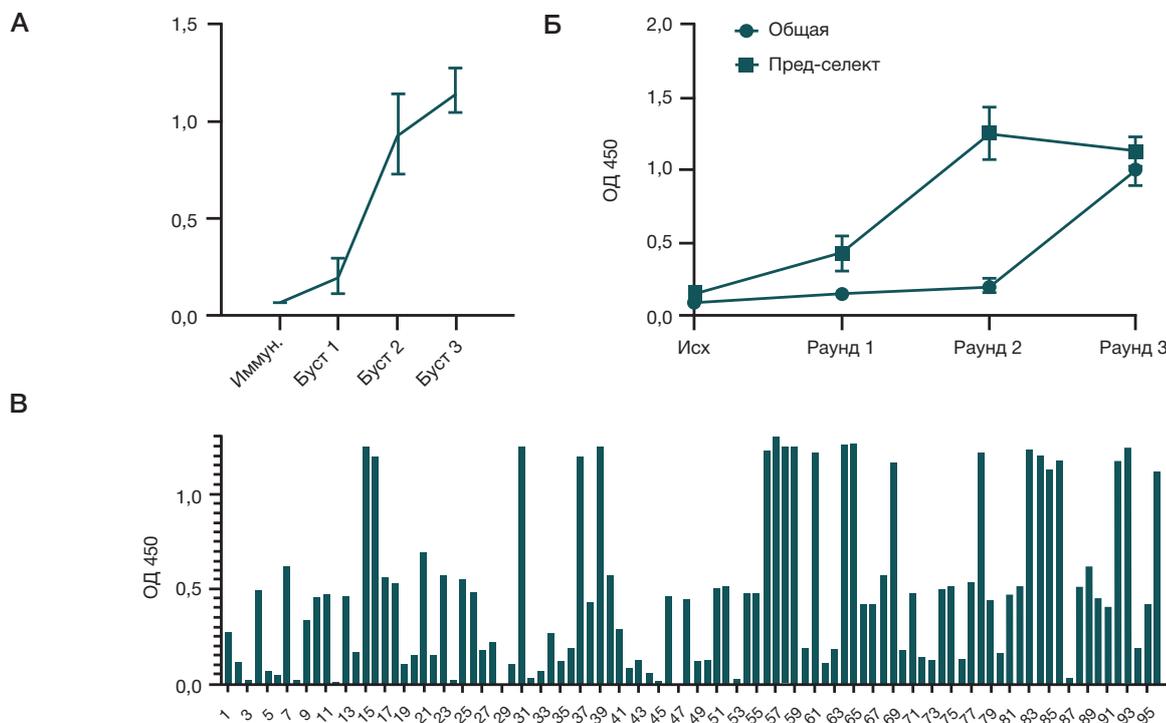


Рис. 1. Селекция наноантител. **А.** Уровни сывороточных антител к мезотелину в крови иммунизированного животного на момент проведения каждого раунда иммунизации. **Б.** Динамика обогащения иммунных фаговых библиотек наноантителами, специфично распознающими мезотелин, после каждого раунда селекции. **В.** Результаты скрининга 96 случайно отобранных клонов (прямая ИФА на мезотелин). 1–48 — клоны из общей библиотеки, 49–96 — клоны из предселектированной библиотеки

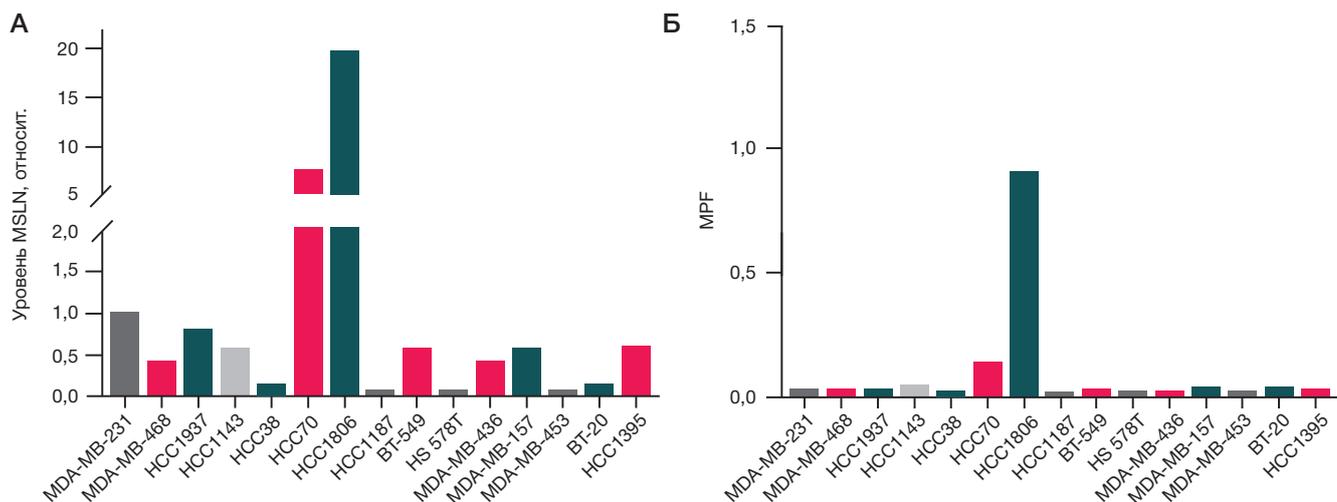


Рис. 2. Определение уровней мезотелина. **А.** Относительные уровни экспрессии MSLN в клеточных культурах ТНРМЖ, согласно данным ПЦР-РВ. **Б.** Уровни МРФ в культуральных средах клеток ТНРМЖ. Приведены медианные значения и стандартные отклонения между биологическими повторностями

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате исследования были успешно идентифицированы специфичные однодоменные антитела к мезотелину. Для приготовления иммунных библиотек применена предселекция иммунных клеток, упрощенно адаптированная согласно данным [24]. В отличие от описанного ранее метода, мы не проводили негативную иммуномагнитную сепарацию для выделения фракции В-лимфоцитов из периферических мононуклеаров, из-за отсутствия коммерчески доступных наборов для выделения В-клеток альпак. Не проводили и проточную сортировку индивидуальных В-клеток, меченых флуоресцентно-конъюгированным антигеном. Вместо этого мы использовали позитивную иммуномагнитную селекцию для выделения В-клеток, которые имеют на своей поверхности целевые В-клеточные рецепторы, при помощи биотинилированного мезотелина. Такой подход позволил более чем в 100 раз сократить количество исходного материала и получить фаговую библиотеку меньшего размера, лишенную нерелевантных вариантов фрагментов антител. Оба идентифицированных анти-MSLN-наноантитела были более представлены в предселектированной библиотеке и обнаруживались при скрининге индивидуальных клонов уже после первого раунда селекции. Можно утверждать, что использование упрощенной

предселекции позволяет минимум втрое сократить время, необходимое для отбора кандидатных клонов, по сравнению с традиционной процедурой селекции. При этом увеличение относительной представленности в исходной библиотеке клонов, обладающих сродством к мишени, может предотвратить потерю редких последовательностей, обладающих уникальными свойствами.

На данный момент уже известны несколько вариантов VHH-антител к мезотелину [17, 18]. Эти наноантитела показывают хорошие результаты как в качестве иммунодиагностических инструментов, так и в виде нацеливающих молекул для терапии наночастицами, и в составе биспецифических терапевтических агентов. Идентифицированные в ходе данной работы наноантитела несколько уступают по аффинности уже известным, однако этот параметр не является определяющим при использовании VHH-фрагмента в составе химерного рецептора. Успешное тестирование MesoVHH-1E3 и MesoVHH-2H5B в качестве захватывающего и детектирующего антитела в сэндвич-ИФА указывает на то, что эти два наноантитела распознают различные эпитопы в составе мезотелина и не имеют препятствий для одновременного связывания с мишенью.

ХАР к мезотелину активно тестируют для терапии многих солидных опухолей [3], в последнее время

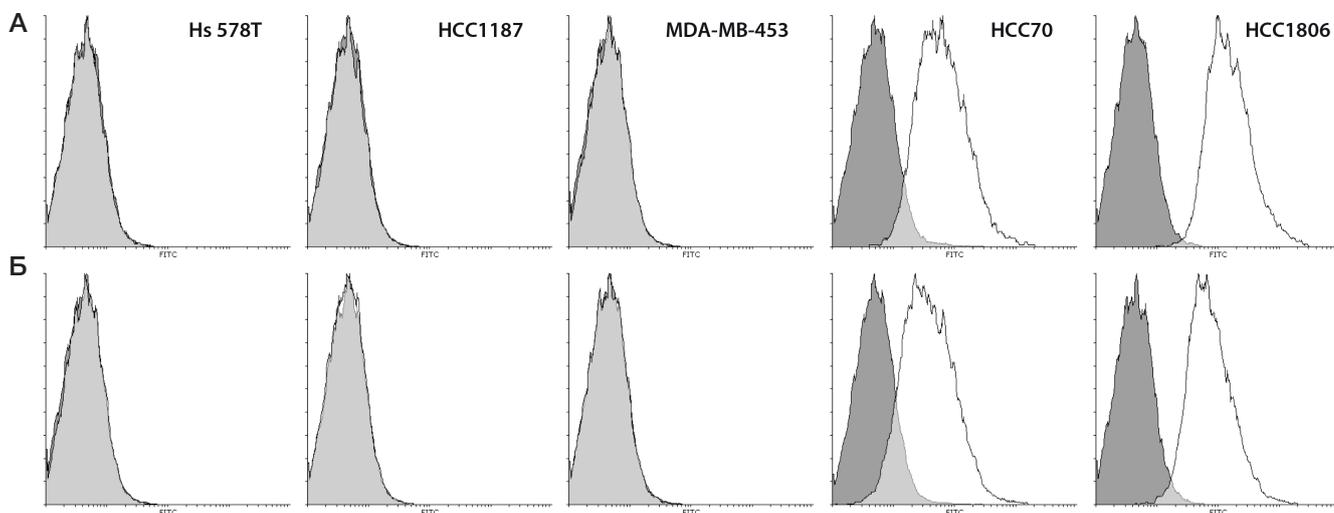


Рис. 3. Тестирование наноантител на культурах ТНРМЖ. Результаты измерения на проточном цитометре модельных клеточных культур ТНРМЖ, меченых MesoVHH-2H5B (**А**) и MesoVHH-1E3B (**Б**). Окрашивание проводили при помощи Streptavidin-FITC

появились работы и о MSLN-опосредованной терапии ТНПМЖ [10]. Для тестирования таких терапевтических подходов *ex vivo* и *in vivo* необходима удобная клеточная модель MSLN⁺ ТНПМЖ, однако имевшиеся данные свидетельствовали, что, несмотря на широкую долю MSLN⁺ первичных культур ТНПМЖ, перевиваемые линии этого субтипа в основном MSLN⁻ [8]. Проведенное нами определение уровней MSLN на широкой панели клеточных линий ТНПМЖ позволило выделить две клеточные линии, подходящие на роль модельных, а также три линии с глубоко супрессированным MSLN, причем для MSLN⁺-линий данные ПЦР-РВ хорошо согласовывались с результатами ИФА клеточных супернатантов на секретируемый фрагмент белка-предшественника мезотелина, MPF. Примечательно, что обе MSLN⁺-клеточные линии обладают хорошей прививаемостью у иммунодефицитных мышей BalbC/nude [25, 26] при ортотопическом введении, что позволяет использовать эту модель для экспериментов *in vivo*.

Тестирование отобранных вариантов наноантител к мезотелину на клеточной модели MSLN⁺ ТНПМЖ продемонстрировало их способность распознавать этот опухолевый антиген в нативных условиях, а низкий уровень фонового сигнала при окрашивании наноантителами MSLN⁺-клеточных линий свидетельствует о высокой специфичности распознавания мишени. Совокупность полученных данных позволяет предположить, что MesoVHH-1E3 и MesoVHH-2H5 могут быть использованы для создания компактных и функционально активных антигенных рецепторов к мезотелину.

ВЫВОДЫ

При помощи модифицированного метода быстрой предселекции клеточного материала иммунизированного животного были идентифицированы два варианта наноантител, способные специфично связывать мезотелин. Активность антител была продемонстрирована в экспериментах *in vitro*, и показано, что VHH-фрагменты распознают различные неперекрывающиеся эпитопы в составе MSLN и могут быть использованы в сэндвич-ИФА. При помощи биослойной интерферометрии определены около 140 и 95 нмоль. Панель клеточных линий ТНПМЖ была протестирована для поиска кандидатных клеточных моделей MSLN⁺ ТНПМЖ, были определены две клеточные линии HCC1806 и HCC70, характеризующиеся высокой и умеренной гиперэкспрессией мезотелина, а также три клеточные линии HCC1187, Hs 578T и MDA-MB-453, в которых мезотелин супрессирован. Отобранные наноантитела к мезотелину оказались способными специфично окрашивать нативный мезотелин на поверхности клеток линий HCC1806 и HCC70, при этом продемонстрировав низкие уровни неспецифического связывания на MSLN⁻-клеточных линиях ПМЖ. Полученные результаты указывают на то, что отобранные наноантитела MesoVHH-1E3 и MesoVHH-2H5 могут быть использованы как для молекулярной идентификации опухолей, так и для создания компактных и функционально активных антигенных рецепторов к мезотелину.

Литература

- Pastan I, Hassan R. Discovery of mesothelin and exploiting it as a target for immunotherapy. *Cancer Res.* 2014; 74 (11): 2907–12. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0337. PubMed PMID: 24824231.
- Einama T, Homma S, Kamachi H, Kawamata F, Takahashi K, Takahashi N, et al. Luminal membrane expression of mesothelin is a prominent poor prognostic factor for gastric cancer. *Br J Cancer.* 2012; 107 (1): 137–42. DOI: 10.1038/bjc.2012.235. PubMed PMID: 22644300.
- Kelly RJ, Sharon E, Pastan I, Hassan R. Mesothelin-targeted agents in clinical trials and in preclinical development. *Mol Cancer Ther.* 2012; 11 (3): 517–25. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0454. PubMed PMID: 22351743.
- Rump A, Morikawa Y, Tanaka M, Minami S, Umesaki N, Takeuchi M, et al. Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion. *J Biol Chem.* 2004; 279 (10): 9190–8. DOI: 10.1074/jbc.M312372200. PubMed PMID: 14676194.
- Bharadwaj U, Marin-Muller C, Li M, Chen C, Yao Q. Mesothelin confers pancreatic cancer cell resistance to TNF-alpha-induced apoptosis through Akt/PI3K/NF-kappaB activation and IL-6/Mcl-1 overexpression. *Mol Cancer.* 2011; 10: 106. DOI: 10.1186/1476-4598-10-106. PubMed PMID: 21880146.
- Li M, Bharadwaj U, Zhang R, Zhang S, Mu H, Fisher WE, et al. Mesothelin is a malignant factor and therapeutic vaccine target for pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther.* 2008; 7 (2): 286–96. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-07-0483. PubMed PMID: 18281514.
- Cheng WF, Huang CY, Chang MC, Hu YH, Chiang YC, Chen YL, et al. High mesothelin correlates with chemoresistance and poor survival in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer.* 2009; 100 (7): 1144–53. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604964. PubMed PMID: 19293794.
- Wang M, Li A, Sun G, Mbuagbaw L, Reid S, Lovrics PJ, et al. Association between mesothelin expression and survival outcomes in patients with triple-negative breast cancer: a protocol for a systematic review. *Syst Rev.* 2016; 5 (1): 133. DOI: 10.1186/s13643-016-0313-6. PubMed PMID: 27514374.
- Fougner C, Bergholtz H, Norum JH, Sorlie T. Re-definition of claudin-low as a breast cancer phenotype. *Nat Commun.* 2020; 11 (1): 1787. DOI: 10.1038/s41467-020-15574-5. PubMed PMID: 32286297.
- Tchou J, Wang LC, Selven B, Zhang H, Conejo-Garcia J, Borghaei H, et al. Mesothelin, a novel immunotherapy target for triple negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012; 133 (2): 799–804. DOI: 10.1007/s10549-012-2018-4. PubMed PMID: 22418702.
- Lanitis E, Poussin M, Hagemann IS, Coukos G, Sandaltzopoulos R, Scholler N, et al. Redirected antitumor activity of primary human lymphocytes transduced with a fully human anti-mesothelin chimeric receptor. *Mol Ther.* 2012; 20(3): 633–43. DOI: 10.1038/mt.2011.256. PubMed PMID: 22127019.
- Fujiwara K, Masutani M, Tachibana M, Okada N. Impact of scFv structure in chimeric antigen receptor on receptor expression efficiency and antigen recognition properties. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020; 527 (2): 350–7. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.03.071. PubMed PMID: 32216966.
- Maus MV, Plotkin J, Jakka G, Stewart-Jones G, Riviere I, Merghoub T, et al. An MHC-restricted antibody-based chimeric antigen receptor requires TCR-like affinity to maintain antigen specificity. *Mol Ther Oncolytics.* 2016; 3: 1–9. DOI: 10.1038/mto.2016.23. PubMed PMID: 29675462.
- Tillib SV. Prospective Applications of Single-Domain Antibodies in Biomedicine. *Mol Biol (Mosk).* 2020; 54 (3): 362–73. Epub 2020/06/04. DOI: 10.31857/S0026898420030167. PubMed PMID: 32492000.
- Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature.* 1993; 363 (6428): 446–8. DOI: 10.1038/363446a0. PubMed PMID: 8502296.

16. Liu W, Song H, Chen Q, Yu J, Xian M, Nian R, et al. Recent advances in the selection and identification of antigen-specific nanobodies. *Mol Immunol.* 2018; 96: 37–47. DOI: 10.1016/j.molimm.2018.02.012. PubMed PMID: 29477934.
17. Prantner AM, Turini M, Kerfelec B, Joshi S, Baty D, Chames P, et al. Anti-Mesothelin Nanobodies for Both Conventional and Nanoparticle-Based Biomedical Applications. *J Biomed Nanotechnol.* 2015; 11 (7): 1201–12. DOI: 10.1166/jbn.2015.2063. PubMed PMID: 26307843.
18. Prantner AM, Yin C, Kamat K, Sharma K, Lowenthal AC, Madrid PB, et al. Molecular Imaging of Mesothelin-Expressing Ovarian Cancer with a Human and Mouse Cross-Reactive Nanobody. *Mol Pharm.* 2018; 15 (4): 1403–11. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00789. PubMed PMID: 29462558.
19. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29 (9): e45. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45. PubMed PMID: 11328886.
20. Fukumoto Y, Obata Y, Ishibashi K, Tamura N, Kikuchi I, Aoyama K, et al. Cost-effective gene transfection by DNA compaction at pH 4.0 using acidified, long shelf-life polyethylenimine. *Cytotechnology.* 2010; 62 (1): 73–82. DOI: 10.1007/s10616-010-9259-z. PubMed PMID: 20309632.
21. Maass DR, Sepulveda J, Pernthaler A, Shoemaker CB. Alpaca (Lama pacos) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *J Immunol Methods.* 2007; 324 (1–2): 13–25. Epub 2007/06/15. DOI: S0022-1759(07)00119-6 [pii] 10.1016/j.jim.2007.04.008. PubMed PMID: 17568607.
22. Benhar I, Reiter Y. Phage display of single-chain antibody constructs. *Curr Protoc Immunol.* 2002; 10 (10): 9B. DOI: 10.1002/0471142735.im1019bs48. PubMed PMID: 18432867.
23. Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif.* 2005; 41 (1): 207–34. PubMed PMID: 15915565.
24. Zost SJ, Gilchuk P, Chen RE, Case JB, Reidy JX, Trivette A, et al. Rapid isolation and profiling of a diverse panel of human monoclonal antibodies targeting the SARS-CoV-2 spike protein. *Nat Med.* 2020; 26 (9): 1422–7. DOI: 10.1038/s41591-020-0998-x. PubMed PMID: 32651581.
25. Liu R, Zhi X, Zhou Z, Zhang H, Yang R, Zou T, et al. Mithramycin A suppresses basal triple-negative breast cancer cell survival partially via down-regulating Kruppel-like factor 5 transcription by Sp1. *Scientific reports.* 2018; 8 (1): 1138. DOI: 10.1038/s41598-018-19489-6. PubMed PMID: 29348684.
26. Simon N, Antignani A, Sarnovsky R, Hewitt SM, FitzGerald D. Targeting a Cancer-Specific Epitope of the Epidermal Growth Factor Receptor in Triple-Negative Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2016; 108 (8). DOI: 10.1093/jnci/djw028. PubMed PMID: 27075852.

References

1. Pastan I, Hassan R. Discovery of mesothelin and exploiting it as a target for immunotherapy. *Cancer Res.* 2014; 74 (11): 2907–12. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0337. PubMed PMID: 24824231.
2. Einama T, Homma S, Kamachi H, Kawamata F, Takahashi K, Takahashi N, et al. Luminal membrane expression of mesothelin is a prominent poor prognostic factor for gastric cancer. *Br J Cancer.* 2012; 107 (1): 137–42. DOI: 10.1038/bjc.2012.235. PubMed PMID: 22644300.
3. Kelly RJ, Sharon E, Pastan I, Hassan R. Mesothelin-targeted agents in clinical trials and in preclinical development. *Mol Cancer Ther.* 2012; 11 (3): 517–25. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0454. PubMed PMID: 22351743.
4. Rump A, Morikawa Y, Tanaka M, Minami S, Umesaki N, Takeuchi M, et al. Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion. *J Biol Chem.* 2004; 279 (10): 9190–8. DOI: 10.1074/jbc.M312372200. PubMed PMID: 14676194.
5. Bharadwaj U, Marin-Muller C, Li M, Chen C, Yao Q. Mesothelin confers pancreatic cancer cell resistance to TNF-alpha-induced apoptosis through Akt/P13K/NF-kappaB activation and IL-6/Mcl-1 overexpression. *Mol Cancer.* 2011; 10: 106. DOI: 10.1186/1476-4598-10-106. PubMed PMID: 21880146.
6. Li M, Bharadwaj U, Zhang R, Zhang S, Mu H, Fisher WE, et al. Mesothelin is a malignant factor and therapeutic vaccine target for pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther.* 2008; 7 (2): 286–96. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-07-0483. PubMed PMID: 18281514.
7. Cheng WF, Huang CY, Chang MC, Hu YH, Chiang YC, Chen YL, et al. High mesothelin correlates with chemoresistance and poor survival in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer.* 2009; 100 (7): 1144–53. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604964. PubMed PMID: 19293794.
8. Wang M, Li A, Sun G, Mbuagbaw L, Reid S, Lovrics PJ, et al. Association between mesothelin expression and survival outcomes in patients with triple-negative breast cancer: a protocol for a systematic review. *Syst Rev.* 2016; 5 (1): 133. DOI: 10.1186/s13643-016-0313-6. PubMed PMID: 27514374.
9. Fougner C, Bergholtz H, Norum JH, Sorlie T. Re-definition of claudin-low as a breast cancer phenotype. *Nat Commun.* 2020; 11 (1): 1787. DOI: 10.1038/s41467-020-15574-5. PubMed PMID: 32286297.
10. Tchou J, Wang LC, Selven B, Zhang H, Conejo-Garcia J, Borghaei H, et al. Mesothelin, a novel immunotherapy target for triple negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012; 133 (2): 799–804. DOI: 10.1007/s10549-012-2018-4. PubMed PMID: 22418702.
11. Lanitis E, Poussin M, Hagemann IS, Coukos G, Sandaltzopoulos R, Scholler N, et al. Redirected antitumor activity of primary human lymphocytes transduced with a fully human anti-mesothelin chimeric receptor. *Mol Ther.* 2012; 20(3): 633–43. DOI: 10.1038/mt.2011.256. PubMed PMID: 22127019.
12. Fujiwara K, Masutani M, Tachibana M, Okada N. Impact of scFv structure in chimeric antigen receptor on receptor expression efficiency and antigen recognition properties. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020; 527 (2): 350–7. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.03.071. PubMed PMID: 32216966.
13. Maus MV, Plotkin J, Jakka G, Stewart-Jones G, Riviere I, Merghoub T, et al. An MHC-restricted antibody-based chimeric antigen receptor requires TCR-like affinity to maintain antigen specificity. *Mol Ther Oncolytics.* 2016; 3: 1–9. DOI: 10.1038/mto.2016.23. PubMed PMID: 29675462.
14. Tillib SV. Prospective Applications of Single-Domain Antibodies in Biomedicine. *Mol Biol (Mosk).* 2020; 54 (3): 362–73. Epub 2020/06/04. DOI: 10.31857/S0026898420030167. PubMed PMID: 32492000.
15. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature.* 1993; 363 (6428): 446–8. DOI: 10.1038/363446a0. PubMed PMID: 8502296.
16. Liu W, Song H, Chen Q, Yu J, Xian M, Nian R, et al. Recent advances in the selection and identification of antigen-specific nanobodies. *Mol Immunol.* 2018; 96: 37–47. DOI: 10.1016/j.molimm.2018.02.012. PubMed PMID: 29477934.
17. Prantner AM, Turini M, Kerfelec B, Joshi S, Baty D, Chames P, et al. Anti-Mesothelin Nanobodies for Both Conventional and Nanoparticle-Based Biomedical Applications. *J Biomed Nanotechnol.* 2015; 11 (7): 1201–12. DOI: 10.1166/jbn.2015.2063. PubMed PMID: 26307843.
18. Prantner AM, Yin C, Kamat K, Sharma K, Lowenthal AC, Madrid PB, et al. Molecular Imaging of Mesothelin-Expressing Ovarian Cancer with a Human and Mouse Cross-Reactive Nanobody. *Mol Pharm.* 2018; 15 (4): 1403–11. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00789. PubMed PMID: 29462558.
19. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29 (9): e45. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45. PubMed PMID: 11328886.
20. Fukumoto Y, Obata Y, Ishibashi K, Tamura N, Kikuchi I, Aoyama K, et al. Cost-effective gene transfection by DNA compaction at pH 4.0 using acidified, long shelf-life polyethylenimine. *Cytotechnology.*

- 2010; 62 (1): 73–82. DOI: 10.1007/s10616-010-9259-z. PubMed PMID: 20309632.
21. Maass DR, Sepulveda J, Pernthaler A, Shoemaker CB. Alpaca (Lama pacos) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *J Immunol Methods*. 2007; 324 (1–2): 13–25. Epub 2007/06/15. DOI: S0022-1759(07)00119-6 [pii] 10.1016/j.jim.2007.04.008. PubMed PMID: 17568607.
 22. Benhar I, Reiter Y. Phage display of single-chain antibody constructs. *Curr Protoc Immunol*. 2002; 10 (10): 9B. DOI: 10.1002/0471142735.im1019bs48. PubMed PMID: 18432867.
 23. Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif*. 2005; 41 (1): 207–34. PubMed PMID: 15915565.
 24. Zost SJ, Gilchuk P, Chen RE, Case JB, Reidy JX, Trivette A, et al. Rapid isolation and profiling of a diverse panel of human monoclonal antibodies targeting the SARS-CoV-2 spike protein. *Nat Med*. 2020; 26 (9): 1422–7. DOI: 10.1038/s41591-020-0998-x. PubMed PMID: 32651581.
 25. Liu R, Zhi X, Zhou Z, Zhang H, Yang R, Zou T, et al. Mithramycin A suppresses basal triple-negative breast cancer cell survival partially via down-regulating Kruppel-like factor 5 transcription by Sp1. *Scientific reports*. 2018; 8 (1): 1138. DOI: 10.1038/s41598-018-19489-6. PubMed PMID: 29348684.
 26. Simon N, Antignani A, Sarnovsky R, Hewitt SM, FitzGerald D. Targeting a Cancer-Specific Epitope of the Epidermal Growth Factor Receptor in Triple-Negative Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2016; 108 (8). DOI: 10.1093/jnci/djw028. PubMed PMID: 27075852.