

УДК 577.27:112.825.083.3

Фаговый дисплей на основе нитчатых бактериофагов: применение для отбора рекомбинантных антител

Н.В. Тикунова*, В.В. Морозова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, 630090, Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8

*E-mail: tikunova@niboch.nsc.ru

РЕФЕРАТ Дисплей пептидов и белков на поверхности нитчатых бактериофагов является мощной методологией для отбора пептидов и белковых доменов, включая антитела. Преимущество этой методологии заключается в прямой физической сцепленности фенотипа и генотипа – анализируемого полипептида и кодирующего его фрагмента ДНК. Разработка комбинаторных библиотек фрагментов антител обеспечивает наличие репертуаров фаговых частиц, экспонирующих огромное разнообразие фрагментов антител. Процедура биопэннинга облегчает отбор антител с высокой аффинностью и специфичностью практически к любым мишеням. Настоящий обзор является введением в методологию фагового дисплея, более детально он представляет дисплей рекомбинантных антител: конструирование фаговых библиотек фрагментов антител, различные стратегии процедуры биопэннинга.

Ключевые слова: фаговый дисплей, нитчатые бактериофаги, фагмиды, комбинаторные библиотеки фрагментов антител, биопэннинг, одноцепочечные антитела, Fab-фрагменты.

ВВЕДЕНИЕ

В середине 80-х годов была разработана новая молекулярно-биологическая методология, совершившая своеобразную революцию в области инженерии пептидов и белков – фаговый дисплей. Эта методология основана на экспериментах Джорджа Смита, проведенных в середине 80-х годов [1]. На первом этапе Смит доказал возможность экспрессии чужеродного белка на поверхности нитчатого бактериофага M13, осуществив встройку гена, кодирующего фрагмент эндонуклеазы рестрикции EcoRI, в единую рамку трансляции с минорным белком оболочки рIII нитчатого бактериофага. Используя поликлональные антитела, специфичные к эндонуклеазе EcoRI, Дж. Смит показал способность бактериофагов, содержащих химерный белок EcoRI–рIII, специфически связываться с соответствующими антителами. На втором этапе в этой работе было показано, что из смеси бактериофагов дикого типа и бактериофагов со встройкой можно отобрать бактериофаги со встройкой, путем аффинного обогащения, с использованием эндонуклеазы EcoRI в качестве антигена.

Из этих экспериментов последовало два важных вывода: во-первых, используя технологию рекомбинантных ДНК, можно создавать популяции бактериофагов различной представительности ($10^6 - 10^{11}$ вариантов), при этом каждый отдельный фаг экспонирует на своей поверхности случайный пептид. Такие популяции назвали «комбинаторные фаговые библиотеки». Во-вторых, сцепленность анализируемого полипептида и кодирующего его генетического

материала в составе одной фаговой частицы обеспечивает возможность простого отбора требуемых вариантов и их анализа.

Для обозначения результата экспрессии чужеродных олиго- и полипептидов в составе поверхностных белков жизнеспособных нитчатых фагов Дж. Смитом был предложен термин «фаговый дисплей» (phage display). Кроме того, была разработана методика «биопэннинга» (biopanning), т.е. аффинного обогащения, которая дает возможность отбирать из фаговой библиотеки бактериофаги, несущие встроенные последовательности, имеющие сродство к определенным лигандам. Термин «biopanning» был предложен в 1988 г. [2]

Небольшое число молекул белка рIII в фаговой частице – всего 5 копий, ограничивает применение фагового дисплея для получения на основе нитчатых бактериофагов искусственных иммуногенов. Однако попытки получить бактериофаги, экспонирующие чужеродные пептиды в составе белка рVIII, представленного в вирионе приблизительно тремя тысячами копий, были неудачными. Лишь исследования, проведенные российскими учеными, позволили определить сайт на N-конце белка рVIII, встройка в который экспонируется на поверхности фага, обладает иммуногенностью, но не приводит к существенным нарушениям в морфогенезе нитчатых бактериофагов [3, 4].

В 1990-х годах метод фагового дисплея был использован для экспонирования антигенсвязывающих фрагментов иммуноглобулинов на поверхности бактериофага fd

[5]. В результате появился новый комбинаторный подход к разработке рекомбинантных антител, являющийся альтернативным традиционной гибридомной технологии. При использовании этого подхода фаговая система заменяет все этапы работы после иммунизации животных и удаления селезенки простыми процедурами манипулирования с ДНК и бактериями, сокращая время получения стабильных клонов, продуцирующих антитела, с месяцев до недель и удешевляя этот процесс.

За годы использования фагового дисплея сложились следующие основные направления его применения:

- Фаговый дисплей пептидов
- Изучение рецепторов и картирование сайтов связывания антител
- Создание иммуногенов и нановакцин
- Картирование сайтов связывания субстратов для протеаз и киназ
- Фаговый дисплей белков и белковых доменов
- Отбор антител с заданными свойствами
- Изучение белок-лигандных взаимодействий
- Скрининг экспрессируемых фрагментов кДНК
- Направленная эволюция белков

В настоящем обзоре будут рассмотрены основные принципы и методология фагового дисплея на основе нитчатых бактериофагов. Наибольшее внимание будет уделено дисплею рекомбинантных антител.

СТРОЕНИЕ И ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ НИТЧАТОГО БАКТЕРИОФАГА

Методология фагового дисплея и успешность ее развития определяется особенностями нитчатых бактериофагов. К настоящему времени известно несколько нитчатых бактериофагов, способных инфицировать грамотрицательные бактерии. Лучше всего охарактеризованы фаги M13, f1 и fd, инфицирующие штаммы *Escherichia coli*, содержащие F-конъюгативную плазмиду. Геном всех этих бактериофагов определен, нуклеотидные последовательности имеют 98 % гомологии [6, 7]. На основании этого сходства, а также вследствие зависимости процесса инфицирования от наличия F-плазмиды данные бактериофаги объединены в группу Ff-фагов.

Геном Ff-фага представлен одноцепочечной ковалентно замкнутой (+)ДНК, 6407(8) н., кодирующей 11 генов. Все гены сгруппированы в геноме согласно их функциям: первая группа (гены II, V, X) кодирует белки, необходимые для репликации фаговой ДНК; вторая группа (гены III, VI, VII, VIII, IX) – белки оболочки; третья группа (гены I, IV, XI) – белки, необходимые для сборки вирионов. Кроме того, в ДНК бактериофага имеется межгенная последовательность (intergenic region), содержащая *ori* для синтеза (+) и (-) цепей ДНК и сайт инициации процесса сборки фаговых частиц (packaging signal).

ДНК Ff-фага заключена в гибкий цилиндр, состоящий из приблизительно 2700 копий белка оболочки pVIII (рис. 1). На одном из концов Ff-фага находится по 5 копий минорных оболочечных белков pIII и pVI, на другом – белки pVII и pIX.

При инфицировании клеток *E. coli* Ff-фагом белок pIII специфически взаимодействует с верхушкой F-пили, представляющей собой белковую трубочку, состоящую из субъ-

единиц пилина. Ретракция пили, вследствие деполимеризации пилиновых субъединиц, притягивает бактериофаг к клетке [8]. После попадания фаговой ДНК в цитоплазму она при помощи ферментов репликации *E. coli* превращается в двуцепочечную плазмидоподобную репликативную форму (RF-молекулу). Такая молекула служит матрицей для транскрипции и трансляции фаговых белков.

Продукция фаговых белков увеличивается по мере накопления RF-молекул, и при достижении определенной концентрации белка pV вновь синтезированная оцДНК обособляется в комплекс ДНК-pV, который необходим для сборки фаговой частицы. Сборка осуществляется в месте плотного контакта клеточной стенки и внутренней мембраны и продолжается до тех пор, пока конец фаговой ДНК не освободится и фаг не выйдет в среду. Сборка фаговых частиц не ведет к лизогении хозяйских клеток, и инфицированные клетки продолжают расти и делиться, хотя и медленнее, чем неинфицированные [9].

ТИПЫ ВЕКТОРНЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ НИТЧАТЫХ БАКТЕРИОФАГОВ

На основе ДНК нитчатых бактериофагов были созданы новые векторные молекулы – «фагмиды», сочетающие свойства плазмиды и фага [10]. Фагмиды содержат *ori* репликации и сигнал упаковки Ff-фага вместе с *ori* репликации выбранной плазмиды, а также ген III, полилинкер и ген устойчивости к антибиототику [11].

Для фагового дисплея были разработаны системы на основе пяти капсидных белков [12], однако наиболее часто используют минорный белок оболочки pIII или мажорный белок оболочки pVIII (рис. 2). Такие векторные системы обозначаются как 3 и 8 системы соответственно [10].

В зависимости от размера чужеродной вставки белок оболочки фага может терять свои первоначальные свойства, при этом нарушаются процесс сборки фаговой частицы или инфицирование клеток, что приводит к нарушению жизнеспособности бактериофага. Для восстановления ин-

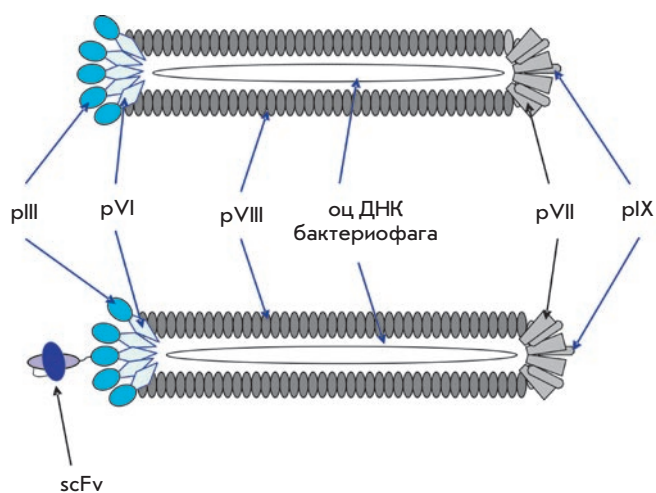


Рис. 1. Схема строения нитчатого бактериофага: а – нитчатый бактериофаг дикого типа; б – фаговое антитело на основе нитчатого бактериофага

фекционности бактериофагов со встройками в оболочечные белки были разработаны такие векторные системы, в которых утраченная фагом инфекционность или способность к нормальной сборке вирионов восстанавливается путем введения дополнительного гена, кодирующего белок рIII или рVIII «дикого» типа. В векторных системах, обозначаемых как 33 или 88, дополнительный ген находится в геноме самого бактериофага вместе с рекомбинантным геном. В векторных системах, обозначаемых 3+3 или 8+8, дополнительный ген вводится в клетку *E.coli* при помощи фага-помощника (helper phage), а рекомбинантный ген находится в фагмиде. В обоих случаях после размножения в клетках бактериофаги содержат как нормальные, так и гибридные белки и могут размножаться, несмотря на наличие чужеродных вставок.

Для векторной системы 8+8 характерна мультивалентность: на поверхности фаговой частицы экспонируются как рекомбинантные, так и дикие белки рVIII, но поскольку рVIII является мажорным белком оболочки, то в среднем на поверхности фага будет экспонировано несколько сотен чужеродных фрагментов. Такое увеличение валентности имеет преимущество в тех случаях, когда необходимо отобрать низкоаффинные лиганды.

Основное свойство 3+3 векторной системы – это фактическая моновалентность: на поверхности фаговой частицы экспонируются как рекомбинантный, так и дикий белок рIII, причем количество копий рекомбинантного белка оболочки варьирует от 0 до 5 на одну фаговую частицу. Следует отметить, что только 10 % бактериофагов содержит хотя бы один химерный белок, количество фагов, несущих 2 и более белка рIII со встройкой, значительно меньше. Около 90 % бактериофагов в популяции вообще не содержат химерных белков [13]. Снижение валентности экспонируемых элементов приводит к ограничению авидности, что позволяет отбирать высокоаффинные молекулы при использовании векторной системы данного типа.

Именно векторная система 3+3 наиболее часто используется для селекции фрагментов антител.

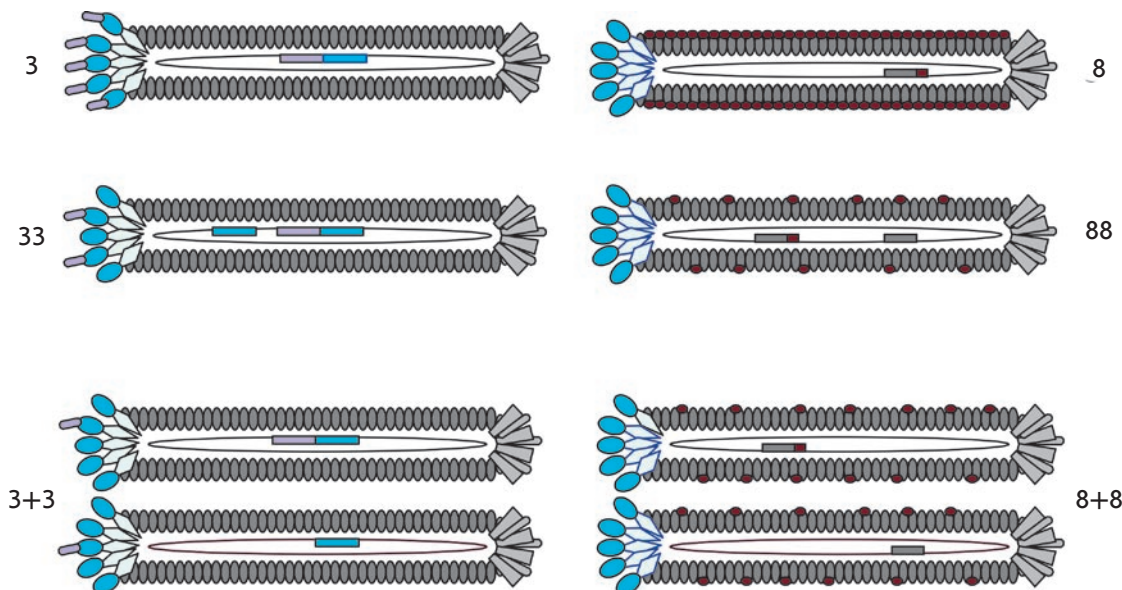
ОСНОВНЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ ЭТАПЫ ФАГОВОГО ДИСПЛЕЯ

Для обеспечения успешного отбора целевых антител, обладающих нужными свойствами, необходимо, во-первых, использовать адекватную библиотеку фаговых антител и, во-вторых, выбрать правильную стратегию биоопаннинга.

Комбинаторная фаговая библиотека антител представляет собой популяцию бактериофагов, каждый из которых экспонирует на своей поверхности в составе химерного белка с рIII уникальный антиген-связывающий домен антитела, чаще всего одноцепочечное антитело (single chain variable fragment – scFv) или Fab-фрагмент (рис. 3). Особенности строения и свойств этих фрагментов антител описаны в обзоре [14]. Для создания библиотеки репертуар амплифицированных с помощью ПЦР ДНК-фрагментов, кодирующих Fab или scFv из различных источников, клонируют в фагмиду в единую рамку трансляции с геном, кодирующим белок рIII (рис. 4). При этом образуется репертуар фагмид, каждая из которых содержит ДНК-фрагмент, кодирующий индивидуальный антигенсвязывающий домен. После трансфекции *E.coli* полученным репертуаром фагмид получают библиотеку бактериофагов, каждый из которых экспонирует на поверхности индивидуальную комбинацию варьируемых доменов тяжелых и легких цепей. Лигирование ДНК и трансформация бактерий являются ключевыми стадиями, т.к. именно от них зависит размер получаемой библиотеки [15].

Характеристика таких библиотек складывается из уровня аффинности получаемых антител, размера библиотеки и его функционального размера. Аффинность отбираемых антител определяется преимущественно размером библиотеки, который часто лимитирован уровнем трансформации клеток *E.coli*. Размером библиотеки является количество клонов, выросших после трансформации *E.coli*

Рис. 2. Типы векторных систем на основе нитчатого бактериофага для дисплея пептидов и белков. Розовым и красным цветом обозначены чужеродные вставки в генах, кодирующих белки рIII и рVIII соответственно



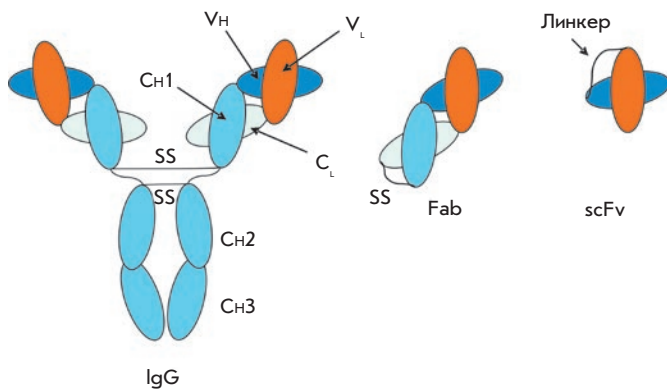


Рис. 3. Природный иммуноглобулин класса G и антигенсвязывающие фрагменты иммуноглобулина

всей популяцией фагмид. Значительно важнее оценивать функциональный размер библиотеки, т.е. количество клонов, содержащих корректно собранные гены, без делеций, сдвига рамки считывания и стоп-кодонов. Функциональный размер библиотеки всегда несколько ниже по сравнению с исходным, но именно он будет определять свойства отбираемых антител [16].

Для отбора целевых антител проводят процедуру биопэннинга – аффинного обогащения библиотеки антителами, специфическими к целевому антигену (рис. 5). Для этого иммобилизованный антиген инкубируют с фаговой библиотекой, затем несвязавшиеся фаговые антитела удаляют, а связавшиеся элюируют и используют для инфицирования клеток *E.coli*. Нарботанные в *E.coli* бактериофаги выделяют и используют для следующего раунда биопэннинга. В идеальном случае достаточно всего лишь одного раунда биопэннинга, но неспецифическое связывание ограничивает степень обогащения за один цикл, и на практике требуется несколько раундов селекции.

Впоследствии из обогащенной библиотеки отбирают индивидуальные антитела, направленные к целевому антигену.

ТИПЫ ФАГОВЫХ БИБЛИОТЕК АНТИТЕЛ

Существует два типа создаваемых *in vitro* фаговых библиотек антител: т.н. «натуральные» и «синтетические» библиотеки, которые подразделяются согласно используемым репертуарам генов.

В настоящее время ряд фаговых библиотек антител получены полностью или частично из натуральных источников: на основе выделенной из периферических лимфоцитов, костного мозга или селезенки мРНК, кодирующей иммуноглобулины [17, 18]. Особый интерес представляют библиотеки антител человека, поскольку полученные из них антитела могут быть использованы в терапии без ограничения.

Так как большинство семейств, кодирующих V-гены человека, редко используются при иммунном ответе, для конструирования библиотек отбираются наиболее часто встречающиеся при иммунном ответе генные семейства: $V_{H1} - V_{H3}$ (из семейств генов тяжелой цепи) и $V_{L1} - V_{L4}$,

а также $V_{\lambda 1} - V_{\lambda 3}$ (из семейств генов легких цепей антител). В разнообразие конструируемых библиотек вносят свой вклад как случайная рекомбинация легкой и тяжелой цепей антитела, так и изменчивость гипервариабельных районов (complementarity determining region – CDR) V_H и V_L цепей.

Натуральные библиотеки антител делятся на «иммунные» (immune) и «наивные» (naïve). Иммунные библиотеки, сконструированные из периферических лимфоцитов людей, иммунизированных каким-либо антигеном, представляют большой интерес для медицинских исследований, т.к. в этом случае более вероятно отобрать антитела, перспективные для терапии [19].

«Наивные» библиотеки, сконструированные на основе мРНК лимфоцитов неиммунизированных здоровых людей, используют для получения антител, специфически направленных к множеству антигенов, в т.ч. и к собственным аутоантигенам [20]. Сконструированные «наивные» библиотеки в большей степени представляют исходный репертуар антител.

Для повышения разнообразия, размера и улучшения свойств антител разработали и стали применять «синтетические библиотеки». Синтетические фаговые библиотеки антител делятся на две группы:

1) синтетические библиотеки на основе одной коровой последовательности V-гена;

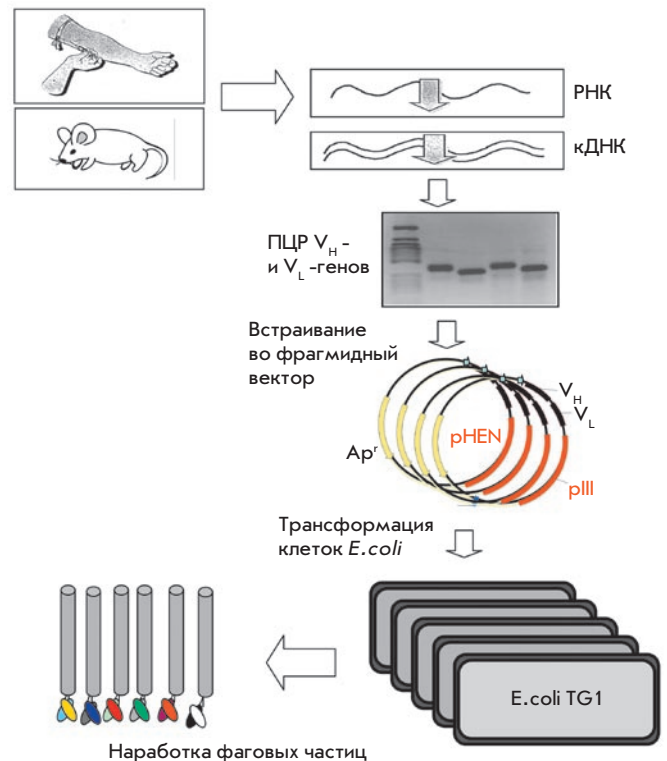


Рис. 4. Схема конструирования фаговой библиотеки фрагментов антител

2) синтетические библиотеки на основе множества коровых V-генов.

Библиотеки первого типа конструируют на основе одного базового гена, в котором с помощью мутагенеза изменяются либо все CDR-районы, либо CDR-районы только V_H-доменов. При этом разнообразие зависит только от вырожденности синтетической ДНК, используемой для изменения последовательностей CDR-петель.

Синтетические библиотеки, сконструированные на основе единой коровой последовательности, имеют ряд преимуществ: их легче конструировать, быстрее анализировать полученные антитела. Однако остается открытым вопрос о том, сможет ли одна коровая последовательность обеспечить корректный фолдинг разнообразным CDR-районам, связывающим антиген, чтобы при этом получилась библиотека, генерирующая широкий спектр высокоаффинных антител.

Синтетические библиотеки второго типа используют в качестве базового не один, а несколько десятков генов, в которых с помощью мутагенеза изменяют либо все CDR-участки, либо только CDR3-участки переменных доменов тяжелых цепей иммуноглобулинов.

При создании как натуральных, так и синтетических библиотек можно использовать различные типы генов, кодирующих экспонируемые на поверхности фаговой частицы антигенсвязывающие домены – Fab, scFv. При этом, соответственно, будут получены комбинаторные фаговые библиотеки Fab- или scFv-фрагментов антител.

Начиная с 1990 г., когда MacCafferty с соавт. впервые продемонстрировали возможность создания библиотеки одноцепочечных антител на поверхности нитчатого бактериофага [5], множество исследований было посвящено разработке библиотек scFv-фрагментов и изучению отобранных из них рекомбинантных антител. Для создания библиотеки одноцепочечных антител популяции V_H- и V_L-генов объединяют в единую ДНК-последовательность с помощью олигонуклеотида, кодирующего гибкий гидрофильный пептид (рис. 3). Этот линкер состоит из аминокислотных остатков глицина и серина (Gly₄ Ser)_n, что обеспечивает гибкость и резистентность к протеазам. Затем полученные scFv-гены клонируют в какой-либо вектор (pHEN1, pHEN2, pSEX и т.д.), который обеспечивает экспрессию scFv-антител в составе химерного белка с оболочечным белком рIII нитчатых бактериофагов. Следует отметить, что наиболее часто тяжелая цепь располагается сразу же за лидерной последовательностью, тогда как легкая цепь фрагмента антитела является слитой с N-концевой последовательностью белка рIII бактериофага. Пептидный линкер облегчает ассоциацию переменных доменов тяжелой и легкой цепей, необходимую для формирования антигенсвязывающей поверхности, и, таким образом, не требуется наличия дисульфидных связей между цепями.

Для очистки и дальнейшей характеристики одноцепочечных антител удобно получать эти белки в секреторируемой форме. В случае использования pHEN, pSEX векторов между 3'-концом антитела и 5'-концом гена белка оболочки фага находится амбер-кодон, и при смене супрессорного штамма на несупрессорный одноцепочечные антитела секретируются в культуральную среду [21].

Fab-фрагменты – это гетеродимеры, состоящие из легкой цепи иммуноглобулинов (V_L-C_L), объединенной с переменным доменом и первым константным доменом тяжелой цепи (V_H-C_{H1}); цепи взаимодействуют друг с другом уже после синтеза обеих цепей, и это взаимодействие стабилизирует формирование антигенсвязывающего сайта (рис. 3). Для создания Fab-библиотеки легкую цепь и Fd-домен (V_H + C_{H1}) клонируют в соответствующем векторе. Ген, кодирующий Fd-домен, объединяют с C-концевой частью белка рIII нитчатого бактериофага. Легкая цепь и тяжелая цепь, слитая с белком рIII нитчатого бактериофага, таким образом, транскрибируются как полицистронная мРНК под контролем какого-либо промотора *E.coli*. На N-конце каждого полипептида располагается лидерная последовательность, которая направляет их к внутренней мембране, где они собираются в фаговую частицу.

Более широкий репертуар Fab-фрагментов может быть получен при последовательной трансформации клеток плазмидой, содержащей V_HC_{H1}-цепи и трансфекции этой же культуры популяцией фагов с репертуаром V_LC_L-цепей. В этом случае необходимо обеспечить полную рекомбинацию цепей, чтобы они упаковывались в одну фаговую частицу для последующей селекции на антигене. Для этого был предложен способ рекомбинации H- и L-цепей *in vivo* путем включения в плазмидную и фагмидную конструкции loxP-сайтов для рекомбиназы фага P1 и использования в качестве штамма-хозяина клетки *E.coli*, продуцирующей рекомбиназу фага [22].

По сравнению с одноцепочечными антителами Fab-фрагменты обычно более стабильны в очищенной форме, обладают более длинным периодом полувыведения и, следовательно, улучшенной фармакокинетикой и фармакодинамикой [14]. Большое значение имеет и то, что Fab-фрагменты могут быть достаточно просто переведены в полноразмерные иммуноглобулины путем объединения C-конца C_{H1} домена с Fc-фрагментом.

КОНСТРУИРОВАНИЕ БИБЛИОТЕК

При конструировании комбинаторных библиотек антител, в зависимости от типа создаваемой библиотеки, используют различные источники генного репертуара. «Наивные» и иммунные библиотеки конструируют, используя естественным образом реорганизованные гены, кодирующие переменные домены иммуноглобулинов здоровых или иммунных к какому-либо антигену доноров, соответственно (рис. 4). Для этого выделяют мРНК клеток лимфоидного ряда, продуцирующих антитела. Чаще всего это лимфоциты периферической крови, но в некоторых случаях используют спленоциты [23, 24], клетки миндалин или В-лимфоциты костного мозга [25, 26]. Для создания иммунной библиотеки антител возможно также использование предварительной иммунизации периферических лимфоцитов крови *in vitro* [27, 28].

На основе мРНК синтезируют кДНК, при этом в качестве праймеров могут быть использованы не только специфические олигонуклеотиды, но и олиго-dT и статистические гексаолигонуклеотиды, что позволяет получать кДНК копии всех возможных вариантов генов, кодирующих переменные домены антител [29]. Кроме того, можно использовать один или несколько праймеров, ограничивающих набор амплифицируемых генов до одного или нескольких

семейств генов переменных доменов или изоформ антител уже на уровне кДНК [30]. Для дизайна праймеров используют информацию из баз данных, например, Data-Base Kabat [31] или V BASE. Последовательность праймеров обычно содержит сайты рестрикции для клонирования ПЦР-продуктов в составе соответствующих векторов.

Конструирование «наивной» библиотеки scFv антител человека было осуществлено Marks с сопр. [30]. Источником генов, кодирующих антитела, были лимфоциты периферической крови двух добровольцев. При синтезе кДНК использовались праймеры, комплементарные консервативным районам генов, кодирующих легкие цепи κ и λ типов и тяжелые цепи IgM и IgG. На основе полученных кДНК в векторе pHEN1 было сконструировано две библиотеки: $V_{H\mu} - V_L$ размером $2.9 \cdot 10^7$ и $V_{H\gamma} - V_L$ размером $1.6 \cdot 10^8$ независимых клонов [30]. Из этой библиотеки были получены различные антитела, специфичные к белкам и гаптенам [30], и антитела, специфичные к аутоантигенам [32], однако константы аффинности отобранных scFv не превышали 10^7 M^{-1} . Вместе с тем даже из библиотек относительно небольшого размера могут быть получены антитела, обладающие большей аффинностью. Так, из scFv-библиотеки размером $4 \cdot 10^7$ независимых клонов были отобраны одноцепочечные антитела с константами аффинности $K_{\text{афф}} 10^7 - 10^8 \text{ M}^{-1}$, специфичные к различным стероидным гормонам [33]. Одноцепочечные антитела к фактору некроза опухолей с константами аффинности порядка $10^7 - 10^8 \text{ M}^{-1}$ отобраны из наивной библиотеки размером $2 \cdot 10^8$ независимых клонов. Для увеличения представительности этой библиотеки была модифицирована схема конструирования scFv-генов: в отличие от работы [30], в которой scFv-гены конструировали с помощью трехкомпонентной ПЦР ($V_H - \text{линкер} - V_L$), здесь была проведена более эффективная двухкомпонентная реакция за счет наличия рестрикционного сайта в линкерной последовательности [16].

Дальнейшие усилия экспериментаторов были направлены на конструирование как можно большего универсального репертуара фрагментов антител, поскольку из большого репертуара ($10^{10} - 10^{11}$) возможно выделить антитела с наномолярными аффинностями против практически любого антигена. Подобная библиотека размером $1.4 \cdot 10^{10}$ была сконструирована на основе генетического материала лимфоидных клеток (периферических лимфоцитов крови и миндалин, В-лимфоцитов костного мозга) 43 неиммунных доноров [25]. Репертуары V_H - и V_L -генов были предварительно клонированы по отдельности в векторы pCantab 6 и pCantab 3His₆ соответственно. Аффинность отобранных из этой библиотеки scFv превышала 10^9 M^{-1} . Как известно, антитела с такой аффинностью появляются в ходе вторичного иммунного ответа. Кроме того, из сконструированной библиотеки были отобраны антитела к различным токсичным антигенам, которые невозможно использовать для иммунизации, что говорит о преимуществах использования больших библиотек по сравнению с гибридной технологией [10]. Из этой же библиотеки были отобраны антитела к антигенам клеточной поверхности [34] и антитела, специфично связывающее углеводы [35]. Наивные библиотеки одноцепочечных антител использовали также для получения scFv, специфичных к нейротоксинам [36], к белкам апоптоза [37] и пр.

При создании большой «наивной» библиотеки Fab-фрагментов антител человека использовали двухэтапную процедуру клонирования [24]. Сначала отдельно клонировали амплифицированные V_H -, $V_{L\kappa}$ - и $V_{L\lambda}$ -гены в вектора, содержащие C_{H1} -, $C_{L\kappa}$ - и $C_{L\lambda}$ -гены соответственно. А затем использовали уже не ПЦР-продукты, обработанные соответствующими рестриктазами, а рестрикционные фрагменты, полученные из первичных репертуаров $V_H C_{H1}$, $V_{L\kappa} C_{L\kappa}$ и $V_{L\lambda} C_{L\lambda}$, что сделало процедуру клонирования более эффективной. Как и в работах по созданию библиотек одноцепочечных антител олигонуклеотиды для амплификации переменных доменов были подобраны так, чтобы как можно более полно охватить весь их репертуар. Размер полученной в итоге библиотеки Fab-фрагментов составил $3.7 \cdot 10^{10}$ независимых клонов, и из нее были отобраны антитела против широкой панели антигенов с аффинностью, варьирующей в пределах от $2.7 \cdot 10^7$ до $3.7 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$.

Конструирование синтетических библиотек. Комбинаторные библиотеки характеризует не только размер, определяемый по количеству независимых трансформантов, но и представительность, т.е. общее количество различных $V_H - V_L$ комбинаций, полученных на уровне ДНК. Способом увеличения разнообразия антител в конструируемой библиотеке может быть увеличение количества доноров, что характерно для натуральных библиотек, но в этом случае репертуар генов, кодирующих антитела, не превысит разнообразия генов лимфоидных клеток, доступных на момент создания библиотеки. По мнению многих авторов, потенциальный размер репертуара антител человека составляет до 10^{12} , но одновременно клетки, продуцирующие антитела, представляют только его часть [37, 38]. Представительность конструируемой библиотеки может быть увеличена за счет замены природных CDR-участков V-генов на химически синтезированные. В этом случае возможно получить комбинаторную библиотеку, содержащую все возможные варианты последовательностей, кодирующих антигенсвязывающие центры антител. Сконструированные подобным образом комбинаторные библиотеки фрагментов антител принято называть синтетическими или полусинтетическими, в зависимости от того, входят ли в состав обоих переменных доменов синтетические участки. Идеальным способом получения репертуара, охватывающего все возможные варианты последовательностей антител, является химический синтез всех шести рандомизированных CDR-районов и соединение их с различными каркасными участками. Но чаще всего рандомизации подвергается CDR3 тяжелой цепи, который вносит наиболее существенный вклад в формирование антигенсвязывающего центра [39].

Первую полусинтетическую библиотеку сконструировали на основе одной легкой цепи без каких-либо изменений в структуре CDR и одной тяжелой цепи, в которой участок CDR3 был заменен примерно на 10^{20} различных вариантов последовательностей [37]. Размер библиотеки составил $5 \cdot 10^7$ клонов, аффинности отобранных антител варьировали от 10^7 до 10^8 M^{-1} .

Позднее при конструировании полусинтетических библиотек на основе одной коровой последовательности мутагенезом изменяли все гипервариабельные районы тяжелой цепи [40]. При этом, выбирая позиции для мутагенеза, учитывали особую вариабельность в последовательностях

природных антител и необходимость хорошей растворимости целевых антител. Эти выбранные позиции были рандомизированы, используя кодоны, которые наиболее часто обнаруживаются в природных антителах.

Наряду с созданием полусинтетических библиотек на основе одной коровой последовательности конструировали библиотеки и на основе репертуара V_H -генов [41, 42]. Так, в библиотеке Nissim использовали 50 V_H -генных сегментов, кодирующих большую часть V-сегментов человека, и случайные нуклеотидные последовательности, кодирующие V_H CDR3 длиной от 12 до 36 п.о. В результате было получено девять V_H -генных репертуаров, различающихся по длине V_H CDR3, и, таким образом, созданы девять фагмидных библиотек. Размер библиотеки, полученной после их объединения, составил 10^8 независимых клонов, и из нее были отобраны антитела против целого ряда антигенов [42].

Еще одна использовавшаяся многими исследователями библиотека Griffin 1 была аналогичным образом сконструирована на основе 50 зародышевых линий генов Vh-доменов тяжелых цепей и генов 6 различных переменных доменов легких цепей, соответствующих шести основным подтипам κ - и λ -цепей. Размер библиотеки составлял 10^8 независимых клонов, и из нее отобраны антитела, специфичные к растворимому рецептору CD4 [43], интерлейкину 6 человека [44], ортопоксвирусу [45], нуклеопротеину вируса Эбола [46]. Эту библиотеку использовали для отбора каталитических антител [47] и пр. [48]

Аффинность антител, полученных из созданных таким образом полусинтетических и синтетических библиотек, не была высокой. Это обусловлено несколькими факторами. Известно, что CDR3 тяжелых цепей в природных антителах сильно варьируют по размеру и могут содержать до 24 аминокислотных остатков, однако создание синтетических CDR3 с большим разбросом длины и полностью случайной структурой малоэффективно. Кроме того, зачастую конформация антител, содержащих синтетические CDR, является некорректной (относительно природной) именно в области CDR-петель [49]. Поэтому исследователи попытались обойти эти препятствия путем ограниченной «рандомизации» и введения фланкирующих участков, окружающих полностью случайные аминокислотные последовательности [49]. В результате была создана библиотека размером $3.6 \cdot 10^8$ клонов, из которой были отобраны scFv к 13 различным антигенам, хотя аффинность отобранных антител оставалась низкой – от $4 \cdot 10^5$ до 10^7 M^{-1} .

Дальнейшие шаги, связанные с преодолением описанных выше ограничений, зависят от использования т.н. «мастер-генов», т.е. генов, кодирующих переменные домены антител с определенными каркасными участками, ограничивающими различные рандомизированные CDR. Так, для создания библиотеки HuCAL в качестве «мастер-генов» использовали V_H - и V_L -семейства, наиболее часто встречающиеся при иммунном ответе, в результате чего 7 V-генов тяжелых цепей и 7 V-генов легких цепей составили комбинацию из 49 базовых генов. Все гены были синтезированы с учетом частоты использования кодонов, кодирующих аминокислотные остатки, которые приводят к белковой агрегации [50]. При создании этой библиотеки авторы учитывали положение ключевых аминокислот в каркас-

ных и гипервариабельных районах, длины гипервариабельных районов и степень их изменчивости. При синтезе олигонуклеотидов, кодирующих CDR3, использовали каскадный тринуклеотидный мутагенез, что исключало из состава CDR-фрагментов терминирующий кодон TAG, а также кодоны, редко встречающиеся в экспрессирующей системе. Из сконструированной библиотеки размером $2 \cdot 10^9$ были отобраны scFv против широкого спектра антигенов, включающего пептиды, белки и целые клетки, с константами аффинности, соответствующими вторичному иммунному ответу (10^9 M^{-1}). Для всех использованных консенсусных каркасов построены трехмерные молекулярные модели, что сделало возможным исследование причин разнообразия природных структурных мотивов, типичных для репертуара антител человека, и корреляции между структурой антитела, его аффинностью, специфичностью и классом антигена, который оно связывает [50, 51].

Аналогичным образом была сконструирована библиотека n-CoDeR™ [52], для создания которой авторы использовали единственный мастер-ген, в который были встроены различные CDR-районы, сформированные *in vivo*. Поскольку были взяты генные последовательности, кодирующие природные CDR, это гарантировало оптимальный уровень правильно собранных и функциональных молекул. Более того, компьютерный анализ показал, что получаемые из библиотеки CoDeR™ молекулы антител менее иммуногенны по сравнению с нормальными человеческими Ig. Из библиотеки были получены антитела, специфичные к углеводам и человеческим аутоантигенам, с аффинностью более чем 10^9 M^{-1} .

Конструирование иммунных библиотек. Несмотря на то что к настоящему моменту сконструировано много универсальных наивных, полусинтетических и синтетических библиотек, стало очевидно, что главная проблема заключается не в создании огромного репертуара фрагментов антител, а в его сохранении в течение длительного времени и, следовательно, отсрочке неизбежного изменения его содержания. Кроме того, при увеличении размера библиотеки возникают и технические неудобства при работе с ней. Например, для амплификации библиотеки размером 10^{10} клонов требуется объем культуры в несколько десятков литров. Это во многом объясняет современную тенденцию предпочтения библиотек меньшего размера, содержащих узконаправленный репертуар антител, полученных из иммунизированных организмов.

Иммунные библиотеки обладают двумя основными характеристиками: они обогащены антиген-специфичными антителами, и аффинность некоторых из этих антител повысилась в ходе развития иммунного ответа. В результате большую представленность в иммунной библиотеке имеют клоны, продуцирующие высокоаффинные антитела к антигену, использованному для иммунизации, появляющиеся в результате вторичного иммунного ответа на антиген. Считается, что в случае библиотек из иммунизированных организмов достаточно получить 10^6 независимых рекомбинантов, чтобы среди них нашлись продуценты scFv, специфично связывающие использованный для иммунизации антиген, тогда как «наивные» библиотеки должны содержать, по крайней мере, 10^8 индивидуальных клонов для воссоздания исходного разнообразия детерминант антител [53].

Первыми иммунными библиотеками были библиотеки против ВИЧ [54], респираторного синцитиального вируса [55], вируса гепатита В [56], вируса простого герпеса и цитомегаловируса [57, 58]. Сконструированы библиотеки против аутоантигенов человека [59–61] и против антигенов, способных вызывать аллергические реакции [62].

На основе генетического материала лимфоцитов пациентов с определенными опухолями были сконструированы библиотеки для отбора антител против специфических опухолевых маркеров [63 – 68]. Созданы иммунные библиотеки против вируса гепатита А [19], вируса ветряной оспы [69], ортопоксвирусов [70] и др. Совсем недавно из иммунных библиотек были получены вируснейтрализующие scFv к антигенам вируса гриппа H5N1 [26, 71] и вируснейтрализующие Fab-фрагменты к вирусу бешенства [72]. Также на основе фрагментов антител, отобранных из иммунных библиотек, созданы полноразмерные антитела человека против ортопоксвирусов [73, 74], антитела, способные нейтрализовать вирус гепатита А [75], полноразмерные вируснейтрализующие антитела человека, специфичные к гликопротеину В цитомегаловируса [76].

Существенным преимуществом иммунных библиотек является возможность отбора высокоаффинных антител, появляющихся после вирусных инфекций или рака, а также антител на аутоантигены, представленные у больных с аутоиммунными заболеваниями. Анализ таких антител может помочь в определении антигенных эпитопов, вовлеченных в гуморальный иммунный ответ. Еще одно преимущество иммунных библиотек – это возможность отбора антител против второстепенных или слабо иммуногенных антигенов.

АФФИННАЯ СЕЛЕКЦИЯ АНТИТЕЛ ИЗ БИБЛИОТЕКИ

Следующим важнейшим этапом после конструирования библиотеки или выбора из уже имеющихся является обогащение исходного репертуара антител, присутствующих в библиотеке, антителами, специфически направленными к целевому антигену (рис. 5). Эта процедура называется также биопэннингом или аффинным обогащением. Ниже приведены различные стратегии биопэннинга.

Биопэннинг с использованием иммобилизованных антигенов. Традиционно биопэннинг проводят с использованием антигена, сорбированного на пластиковой поверхности, например, иммунопробирок (Maxisorb tubes; Nalge Nunc Intl., Naperville, IL) или планшетов для ИФА [30, 78]. Биопэннинг также может быть проведен путем аффинной хроматографии, при этом целевой антиген иммобилизуют на колонку [43, 79]. Колонку промывают, для того чтобы избавиться от неспецифичных клонов, а затем специфично связавшиеся фаговые антитела элюируют с колонки и нарабатывают в клетках *E. coli*. В качестве носителей антигена для аффинной селекции также могут быть использованы чипы сенсоров VIAcore [80]. При биопэннинге таким методом следует учитывать конформационную стабильность антигена. Некоторые фаговые антитела, отобранные против адсорбированных антигенов, могут не распознавать нативную форму антигена. Один из способов обойти эту проблему – непрямая посадка антигена с использованием антигенспецифичных антител [81].

Для элюции специфически связавшихся антител используют растворы кислот, например HCl, глициновый буфер [78, 82], растворы оснований, например триэтиламин [30]. При этом сразу после элюции необходимо нейтрализовать элюат, содержащий фаговые антитела, доведя уровень pH до 7.2–7.4. Антитела также можно элюировать при помощи расщепления протеазой специально введенного сайта между антителом и белком рIII [83]. Кроме того, антитела можно элюировать, используя конкурентное связывание при помощи избытка антигена [16, 43].

Биопэннинг с использованием раствора антигена. При иммобилизации антигена на твердую поверхность зачастую возникают проблемы с конформационными изменениями молекул антигена. Для того чтобы избежать нарушений конформации, используют методики, позволяющие антителу связываться с антигеном в растворе. При этом использование меченых растворимых антигенов дает возможность более точной оценки количества антигена, используемого во время селекции [84], и, следовательно, позволяет использовать меньшие концентрации антигена, что приводит к отбору высокоаффинных антител. После инкубации антител с антигеном, пришитым к биотину, фаги, связавшиеся с мечеными антигенами, удаляют при помощи покрытых авидином или стрептавидином парамагнитных шариков. В результате специфично связавшиеся фаги отделяются от антигена и могут быть охарактеризованы. Недостатком этого метода является то, что также отбираются и антитела на стрептавидин. Эта проблема может быть решена добавлением еще одной стадии – инкубации популяции антител с шариками, покрытыми стрептавидином для удаления стрептавидин-специфичных антител.

Биопэннинг на клетках. Прямой отбор антител против маркеров на клеточной поверхности может быть проведен

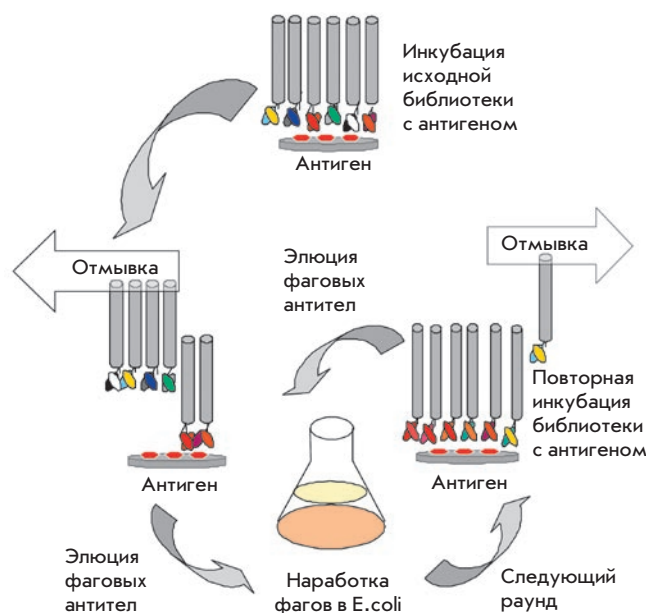


Рис. 5. Схема процедуры биопэннинга

либо на монослой клеток, либо с использованием клеточной суспензии. Несвязавшиеся фаговые антитела удаляют в случае монослоя промыванием чашек с культурами клеток или центрифугированием в случае суспензии. Для того чтобы оптимизировать отбор антигенспецифичных антител и минимизировать отбор случайно связавшихся антител, используют негативную селекцию, которую можно вести перед позитивной селекцией, после нее, а также одновременно [49]. В случае одновременного проведения позитивной и негативной селекции создают конкурентные условия: небольшое число антигенположительных (целевых) клеток и избыток антигенотрицательных «адсорбирующих» клеток, которые связывают неспецифичные антитела из фаговой библиотеки. Для того чтобы отделить нужные клетки со связавшимися к их поверхности фаговыми антителами, используют флуоресцентно меченные антитела, специфичные к другому антигену, заведомо присутствующему на целевых клетках, а затем эти клетки отделяют методом проточной цитометрии (FACS).

Используя подобную методику, из Fab-библиотеки выделили анти-Rh(D) Fab-антитела, представляющие большой интерес для клинического применения [85]. Подобные подходы могут быть использованы для идентификации опухоли-специфичных антигенов и быстрого высокопродуктивного метода отбора фрагментов антител против конформационно зависимых поверхностных клеточных маркеров. Так, scFv-библиотеку подвергли трем раундам позитивной селекции на клетках человеческой меланомы и негативной селекции на человеческих мононуклеарных клетках периферической крови [64]. В результате были отобраны два scFv, распознающие клетки меланомы в ИФА и FACS [64]. Аналогично селекцию можно вести с использованием фрагментов различных тканей.

Разработан способ отбора антител, способных проникать в эукариотические клетки с помощью рецептор-зависимого эндоцитоза. Селекцию в этом случае проводят в условиях, максимально способствующих активному эндоцитозу, в результате чего после лизиса клеток получают популяцию фаговых антител, способных проникать внутрь эукариотических клеток [86, 87]. Предполагается, что такие антитела могут служить средством внутриклеточной доставки различных лекарств.

Биопэннинг *in vivo*. Этот метод предполагает введение репертуара фаговых антител непосредственно в организм животных. Затем ткани извлекают и получают фаговые антитела, связавшиеся с тканеспецифичными клеточными маркерами, аналогично тому, как это было сделано в случае пептидных библиотек [88]. Биопэннинг *in vivo* имеет несколько преимуществ: во-первых, выделенные антитела селективно связываются с интактными целевыми мишенями; во-вторых, сразу элиминируются антитела, узнающие нецелевые белки клеточной поверхности и белки плазмы. Антитела, полученные с помощью биопэннинга *in vivo* и биопэннинга на клетках, могут быть полезными в функциональном анализе новых рецепторов и в поиске потенциальных мишеней для новых лекарств.

Следует отметить, что большинство существующих методов селекции антител предполагают отбор к одному или нескольким антигенам. Вместе с тем разработаны стратегии биопэннинга, позволяющие вести параллельный

отбор антител на популяцию различных антигенов – т.н. «двумерный дисплей». Так, было предложено использовать метод мультиплексной проточной цитометрии для одновременной высокопроизводительной селекции индивидуальных антител на множество различных антигенов, представленных на поверхности клеток [89]. Альтернативным методом одновременного отбора на популяцию антигенов является метод комбинаторной селекции пар антиген-антитело, способных к репликации. Подобным образом отобрали из фаговой библиотеки scFv против антигенов, представленных в дрожжевой библиотеке [90].

ПРОБЛЕМЫ И УСПЕХИ ДИСПЛЕЯ НА ОСНОВЕ НИТЧАТЫХ БАКТЕРИОФАГОВ

При конструировании и использовании библиотек на основе нитчатых бактериофагов многие исследователи сталкиваются с различными трудностями. Так, при конструировании иммунных библиотек существуют проблемы, связанные с низкой концентрацией исходных антигенспецифичных лимфоцитов в популяции. Для преодоления подобных проблем в качестве предварительного этапа при создании такого рода узконаправленных библиотек можно использовать антиген-специфическое обогащение популяции В-лимфоцитов с помощью молекул антигена, присоединенных к магнитным шарикам [91, 92].

Следующая проблема заключается в том, что с помощью процедуры биопэннинга трудно обогатить библиотеку антител так, чтобы впоследствии отбирать специфические антитела, обладающие высокой аффинностью. Еще одна проблема – это уменьшение доли фагов с полноразмерной вставкой в ходе наработки библиотеки. При проверке размеров генов, кодирующих антитела, было показано, что после раунда биопэннинга количество клонов с дефектной вставкой увеличивается [16]. Фаги со вставкой меньшего размера (обычно с отсутствующим V_H районом) в смешанных культурах имеют тенденцию к более быстрому росту, чем фаги с полноразмерной вставкой, что и приводит к их преимущественной наработке. Именно поэтому так важно правильно выбрать стратегию биопэннинга. Варьируя условия элюции и скрининга в ходе селекции, можно добиться отбора высокоаффинных антител.

Еще одна проблема связана с тем, что существуют значительные различия между теоретически возможным разнообразием, обеспечиваемым всей популяцией фагмид конкретных библиотек, и реально представленным разнообразием антител. Наличие таких различий объясняется не только пределом эффективности трансформации. Причинами могут быть также токсичность для клеток антител, продуцируемых в ходе бактериальной экспрессии, неправильный фолдинг или сборка, конкуренция между диким типом белка рIII и химерным белком, протеолиз экспонированного на поверхности фага антигенсвязывающего домена и некоторые другие.

Вместе с тем, несмотря на существующие методические проблемы, технология фагового дисплея успешно развивается. Эта технология является привлекательным инструментом по ряду причин. Используя фаговые библиотеки фрагментов антител человека, можно отказаться от применения для терапии химерных или гуманизированных антител и, таким образом, избежать проблем, связанных

с иммуногенностью препаратов. Библиотеки фрагментов антител позволяют быстро изолировать специфические антиген-связывающие домены человеческого происхождения без ограничений, связанных с доступностью донорских лимфоцитов или проблемами слияния клеток. Еще одним преимуществом комбинаторных библиотек является их универсальность – возможность использования одной библиотеки для неоднократного скрининга против различных антигенов. Несомненным достоинством данной технологии является возможность отказа от использования лабораторных животных, а также относительная простота в исполнении и возможность скрининга большого количества кандидатных молекул за короткий промежуток времени. Чрезвычайно важной является возможность отбора анти-

тел против широкого круга антигенов, включая токсичные вещества или особо опасные вирусы, иммунизация которыми невозможна по этическим причинам. Технология фагового дисплея уже доказала свою эффективность в разработке терапевтических антител. В последние годы только на фармацевтическом рынке США продается более 14 антител, антигенсвязывающие домены которых получены методом фагового дисплея [15]. Все это объясняет факт притока крупных компаний, таких как Morphosys GmbH (Германия; <http://www.morphosys.com>); Cambridge Antibody Technology (Великобритания; <http://www.catplc.co.uk>) и Duax (США; <http://www.duax.com>) и др., в область разработки и применения комбинаторных фаговых библиотек фрагментов антител. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Smith G. // *Science*. 1985. V. 228. P. 1315–1317.
- Parmley S., Smith G. // *Gene*. 1988. V. 73. P. 305–318.
- Ильичев А., Миненкова О., Татков С. и др. // Доклады АН СССР. 1989. Т. 307. С. 481–483.
- Minnenkova O., Ilyichev A., Kishchenko G. // *Gene*. 1993. V. 128. P. 85–88.
- MacCafferty J., Griffiths A., Winter G., et al. // *Nature*. 1990. V. 348. P. 552–554.
- Van Wezenbeek P., Huloenmakers J.G. // *Gene*. 1980. V. 11. P. 129–148.
- Beck E., Zink B. // *Gene*. 1981. V. 16. P. 35–58.
- Maneewannakul K., Maneewannakul S., Ippen-Ihler K. // *J. Bacteriol.* 1993. V. 175. P. 1384–1391.
- Model P., Russel M. *The bacteriophages*. V. 2. N.Y.: Plenum, 1988. P. 456.
- Kay B., Winter G., McCafferty J. *Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual*. N.Y.: Academic press. 1996. P. 306.
- Mead D., Kemper B. // *Biotechnology*. 1988. V. 10. P. 85–102.
- Mullen L., Nair S., Ward J., et al. // *TRENDS in Microbiol.* 2006. V. 14. P. 141–147.
- Griffiths A., Duncan A. // *Curr. Opin. Biotech.* 1998. V. 9. P. 102–108.
- Деев С., Лебедево Е. // *Acta Naturae*. 2009. Т. 1. С. 32–50.
- Azzazy H., Highsmith W. // *Clin. Biochem.* 2002. V. 35. P. 425–445.
- Батанова Т., Улитин А., Морозова В. и др. // *Мол. генет. микробиол. вирусол.* 2006. Т. 3. С. 35–41.
- Blazek D., Celer V. // *Folia Microbiol.* 2003. V. 48. P. 687–698.
- Chingwei V., Blazek D., Celer V., et al. // *J. Virol. Methods*. 2004. V. 115. P. 83–82.
- Kim S., Jang M., Stapleton J., et al. // *Virology*. 2004. V. 318. P. 598–607.
- Nagano K., Imai S., Mukai Y., et al. // *Pharmazie*. 2009. V. 64. P. 238–241.
- Barbas C. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 1993. V. 4. P. 526–530.
- Zahra D., Vancov T., Dunn J., et al. // *Gene*. 1999. V. 227. P. 49–54.
- Sheets M., Amersdorfer P., Finnern R., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. P. 6157–6162.
- de Haard H., van Neer N., Reurs A., et al. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 18218–18230.
- Vaughan T., Williams A., Pritchard K., et al. // *Nat. Biotechnol.* 1996. V. 14. P. 309–314.
- Kashyap A., Steel J., Oner A., et al. // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008. V.105. P. 5986–5991.
- Yamashita M., Katakura Y., Shim S., et al. // *Cytotechnology*. 2002. V. 40. P.161–165.
- Yamashita M., Katakura Y., Shirahata S. // *Cytotechnology*. 2007. V. 55. P. 55–60.
- Улитин А., Капралова М., Ламан А. и др. // *ДАН*. 2005. Т. 405. С. 1–4.
- Marks J., Hoogenboom H., Bontert T., et al. // *J. Mol. Biol.* 1991. V. 222. P. 581–597.
- Johnson G., Wu T. // *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29. P. 205–206.
- Griffiths A., Malmqvist M., Marks J., et al. // *EMBO J.* 1993. V. 12. P. 725–734.
- Dorsam H., Rohrbach P., Kurscher T., et al. // *FEBS Lett.* 1997. V. 1. P. 7–13.
- Hoogenboom H., Lutgerink J., Pelsers M., et al. // *Eur. J. Biochem.* 1999. V. 260. P. 774–784.
- Foy B., Killeen G., Frohn R., et al. // *J. Immunol. Methods*. 2002. V. 261. P. 73–83.
- Cardoso D., Nato F., England P., et al. // *Scand. J Immunol.* 2000. V. 51. P. 337–344.
- Barbas C., Bain J., Hoekstra D., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. V. 89. P. 4445–4457.
- Winter G., Griffiths A., Hawkins R., et al. // *Annu. Rev. Immunol.* 1994. V. 12. P. 433–455.
- Xu J., Davis M. // *Immunity*. 2000. V. 13. P. 37–45.
- Lee C., Sidhu S., Fuh G. // *J. Immunol. Meth.* 2004. V. 284. P. 119–132.
- Tomlinson I., Walter G., Marks J., et al. // *J. Mol. Biol.* 1992. V. 227. P. 776–798.
- Nissim A., Hoogenboom H., Tomlinson I., et al. // *EMBO J.* 1994. V. 13. P. 692–698.
- Griffiths A., Williams S., Hartley O., et al. // *EMBO J.* 1994. V. 13. P. 3245–3260.
- Krebs V., Griffin H., Winter G., et al. // *J Biol Chem.* 1998. V. 273. P. 2858–2865.
- Tikunova N., Morozova V., Batanova T., et al. // *Hum. Antibodies*. 2001. V. 10. P. 95–99.
- Тикунова Н., Батанова Т., Чепурнов А. // *Вопр. вирусол.* 2005. Т. 50. С. 25–29.
- Reshetnyak A., Armentano M., Ponomarenko N., et al. // *J Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. P. 16175–16182.
- Морозова В., Тикунова Н., Батанова Т. // *Вестник РАМН*. 2004. С. 22–27.
- de Kruijff J., Boel E., Logtenberg T. // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 248. P. 97–105.
- Knappik A., Ge L., Honegger A., et al. // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 296. P. 57–86.
- Rothe C., Urlinger S. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 376. P. 1182–1200.
- Carlsson R., Soderlind E. // *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2001. V. 1. P. 102–108.
- Gavilondo J., Larrick J. // *Biotechniques*. 2000. V. 29. P. 128–138.
- Burton D., Barbas C., Persson M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88. P. 10134–10137.
- Barbas C., Crowe J., Cababa D., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. V. 89. P. 10164–10168.
- Zebedee S., Barbas C., Hom Y., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. V. 89. P. 3175–3179.
- Williamson R., Burioni R., Sanna P., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. V. 90. P. 4141–4145.
- Burioni R., Williamson R., Sanna P., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. V. 91. P. 355–359.
- Welschof M., Terness P., Kolbinger F., et al. // *J. Immunol. Methods*. 1995. V. 179. P. 203–214.
- Chapal N., Chardes T., Bresson D., et al. // *Endocrinology*. 2001. V. 142. P. 4740–4750.
- Raats J., Roeffen W., Litjens S., et al. // *Eur. J. Celliol.* 2003. V. 82. P. 131–141.
- Padavattan S., Flicker S., Scrimmer T., et al. // *J. Immunol.* 2009. V. 182. P. 2141–2151.
- Mao S., Gao C., Lo C., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96. P. 6953–6958.
- Kupsch J., Tidman N., Kang N., et al. // *Clin. Cancer Res.* 1999. V. 5. P. 925–931.
- Li J., Pereira S., Van Belle P., et al. // *J. Immunol.* 2001. V. 166. P. 432–438.
- Schmidt A., Muller D., Mersmann M., et al. // *Eur. J. Biochem.* 2001. V. 268. P. 1730–1738.
- Dantas-Barbosa C., Brigido M., Maranhao A. // *Genet. Mol. Res.* 2005. V. 4. P. 126–140.
- Figini M., Obici L., Mezzanatica D., et al. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2009. V. 58. P. 531–546.
- Kausmally L., Waalen K., Lobersli I., et al. // *J. Gen. Virol.* 2004. V. 85. P. 3493–3500.
- Дубровская В., Улитин А., Ламан А., и др. // *Мол. Биол.* 2007. Т. 41. С. 173–185.
- Throsby M., van der Brink E., Jongeneelen M., et al. // *PLoS One*. 2008. V. 3. P. 3942.
- Houimel M., Dellagi K. // *J Virol. Methods*. 2009. V. 161. P. 205–215.
- Schmaljohn C., Cui Y., Kerby S., et al. // *Virology*. 1999. V. 258. P. 189–200.
- Юн Т., Тикунова Н., Шингарова Л., и др. // *ДАН*. 2007. Т. 407. С. 98–101.
- Cao J., Meng S., Li C., et al. // *J. Med. Virol.* 2008. V. 80. P. 1171–1180.
- Ohta A., Fujita A., Murayama T., et al. // *Microbes Infect*. 2009. V. 11. P. 1029–1036.
- Cai X., Garen A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995. V. 92. P. 6537–6541.
- Kang A., Barbas C., Janda K., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88. P. 4363–4366.
- Garrard L., Henner D. // *Gene*. 1993. V. 128. P. 103–109.
- Malmberg A., Duenas M., Ohlin M., et al. // *J. Immunol. Methods*. 1996. V. 198. P. 51–57.
- Sanna P., Williamson R., De Logu A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995. V. 92. P. 6439–6443.
- Roberts B., Markland W., Siranosian K., et al. // *Gene*. 1992. V. 121. P. 9–15.
- Ward R.L., Clark M.A., Lee J., et al. // *J. Immunol. Methods*. 1996. V. 189. P. 73–82.
- Hawkins R., Russell S., Winter G. // *J. Mol. Biol.* 1992. V. 226. P. 889–896.
- Siegel D., Chang T., Russell S., et al. // *J. Immunol. Methods*. 1997. V. 206. P. 73–85.
- Nielsen U., Marks J. // *Pharm. Sci. Technol. Today*. 2000. V. 3. P. 282–291.
- Poul M. // *Meth. Mol. Biol.* 2009. V. 562. P. 155–163.
- Pasqualini R., Ruoslahti E. // *Nature*. 1996. V. 380. P. 364–366.
- Ayriss J., Valero R., Bradbury A., et al. // *Methods mol. Biol.* 2009. V. 525. P. 241–260.
- Bowley D., Jones T., Burton D., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. P. 1380–1385.
- Koefoed K., Farnes L., Wang M., et al. // *J. Immunol. Methods*. 2005. V. 297. P. 187–220.
- Ditzel H. // *Methods Mol. Biol.* 2009. V. 562. P. 37–43.