

УДК 57.083:571.27:579.69

# Фингерпринтный анализ селекции наноантител методом фагового дисплея с использованием двух вариантов фагов-помощников

С. В. Тиллиб\*, Т. И. Иванова, Л. А. Васильев

Учреждение Российской академии наук Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

\*E-mail: tillib@genebiology.ru

Поступила в редакцию 06.07.2010 г.

**РЕФЕРАТ** Представленная работа посвящена анализу процесса селекции методом фагового дисплея нуклеотидных последовательностей мини-антител (наноантител) с заданной специфичностью на основе генерируемой библиотеки антигенсвязывающих доменов особых одноцепочечных антител иммунизированного верблюда. Проведено полномасштабное сравнение эффективности проводимой параллельно селекции с использованием как традиционного (M13KO7), так и модифицированного (с N-концевой делецией в поверхностном белке gIII) фагов-помощников. Показано, что это два взаимодополняющих метода, параллельное использование которых может заметно повысить эффективность селекции. С целью идентификации индивидуальных вариантов отбираемых клонов предложен метод параллельного рестрикционного анализа (фингерпринтирования) амплифицированных с помощью ПЦР клонированных последовательностей, кодирующих мини-антитела, – НМР-анализ, частично заменяющий секвенирование. Получены уникальные данные об отборе вариантов мини-антител с требуемой специфичностью на разных стадиях многостадийной процедуры селекции. Продемонстрирован дифференциальный характер отбора вариантов последовательностей, кодирующих мини-антитела, на разных стадиях селекции, игнорирование чего может вести к потере некоторых вариантов искомым мини-антител.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** иммунизация, фаговый дисплей, фаг-помощник, рекомбинантное мини-антитело, фингерпринтирование.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ИФА – иммуноферментный анализ; БСА – бычий сывороточный альбумин; hp – фаг-помощник; ПЦР – полимеразная цепная реакция; HA-таг – антигенная детерминанта, фрагмент из 9 аминокислот (YRYDVDPYA) белка гемагглютинирина вируса гриппа, который эффективно узнается коммерчески доступными антителами; НМР-анализ – предложенный в данной работе метод параллельного рестрикционного анализа последовательностей генов мини-антител с использованием трех рестриктаз (HinfI, MspI, RsaI); TNF, или TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли (фактор некроза опухоли- $\alpha$ , англ. tumor necrosis factor) – внеклеточный многофункциональный провоспалительный цитокин; PBS – натрий-фосфатный буферный раствор (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4).

## ВВЕДЕНИЕ

Данная работа выполнена в рамках проектов, посвященных разработке новых средств пассивной иммунизации для профилактики и иммунотерапии инфекционных заболеваний человека и животных, в частности бешенства и сибирской язвы. В представленной статье основное внимание уделено анализу отбираемых вариантов последовательностей, кодирующих особые мини-антитела, на различных этапах процедуры селекции, базирующейся на технологии фагового дисплея [1–3].

Начав в 2003 г. с совместной работы с лабораторией проф. С. Муилдерманса (S. Muyldermans, Vrije Universiteit Brussel, Belgium), вот уже несколько лет мы разрабатываем и используем для решения разнообразных задач новую перспективную технологию генерирования особых верблужьих одноцепочечных мини-антител (наноантител, или nanobodies®).

Наноантитела представляют собой антиген-узнающие молекулы – фрагменты (вариабельные домены) особых антител, встречающихся (наряду с классическими антителами) в природе лишь у пред-

ставителей семейства Верблюдовых и некоторых видов акул [4, 5]. Эти «верблюдоспецифические» антигена состоят из димера только одной укороченной (без первого константного района СН1) тяжелой цепи иммуноглобулина и полнофункциональны в отсутствие легкой цепи иммуноглобулина. Для собственно специфического узнавания и связывания антигена при этом необходим и достаточен лишь один вариабельный домен этого антитела. Генерируемые одноцепочечные мини-антитела, в отличие от большинства чисто рекомбинантных антител, обычно обладают весьма высоким сродством к заданному антигену благодаря тому, что первая стадия их получения протекает в организме животного (из сем. Верблюдовых), где происходит их аффинное созревание *in vivo*. По сравнению с традиционными антителами наноантитела обладают рядом преимуществ, что позволяет предполагать большой потенциал их будущего использования в различных исследованиях и при создании новых биотехнологических устройств, а также в клинических целях для диагностики и лечения заболеваний. В число этих преимуществ входят меньший размер и новые структурные особенности (лучшее проникновение внутрь ткани, узнавание скрытых для обычных антител эпитопов), экономичность и простота наработки в больших количествах (в бактериях или дрожжах), хорошая растворимость, устойчивость к значительным колебаниям температуры и рН, простота всевозможных генно-инженерных манипуляций [5, 6]. Важно отметить, что верблюжьи вариабельные домены не вызывают выраженного иммунного ответа у приматов, и по структуре они весьма гомологичны вариабельным доменам одного из классов иммуноглобулинов (IgG3) человека. Было показано [7], что можно «гуманизировать» такие верблюжьи мини-антитела без заметной потери их специфической активности, проведя небольшое число точечных замен аминокислот. Это открывает потенциальную возможность широкого использования мини-антител в качестве средств пассивной иммунизации для предотвращения развития различных опасных инфекционных заболеваний [5, 7–9].

Если первой принципиальной стадией получения наноантител в используемом нами методе является индукция образования специфических антител в организме верблюда (или ламы) в результате иммунизации, то вторая принципиальная стадия – собственно отбор методом фагового дисплея клонов нуклеотидных последовательностей заданных наноантител из генерируемой библиотеки всего репертуара вариабельных доменов особых антител данного иммунизированного животного. Эта стадия селекции совсем не тривиальна и весьма слабо исследована. В данной работе мы тщательно проследили как идет отбор заданных последовательностей, а также срав-

нили методы, в которых используются два разных фага-помощника. В недавно опубликованной работе [10] мы предложили использовать модифицированную версию фага-помощника для повышения эффективности отбора антиген-узнающих доменов особых одноцепочечных верблюжьих антител (наноантител) методом фагового дисплея на основе нитчатого фага M13. Использование в качестве фага-помощника мутантного фага M13KO7, названного hrΔMVPIII (содержит делецию N-концевой области белка gIII фага M13, что нарушает способность фага заражать клетки бактерий, но не мешает формированию фаговой частицы), потенциально может заметно повысить эффективность процедуры селекции. Это было продемонстрировано на модельной системе, включающей финальную (третью) стадию селекции наноантител, связывающихся с фактором некроза опухолей, TNF-α, из библиотеки, уже предварительно специфически обогащенной в ходе двух традиционных процедур селекции. В данной работе проведено полномасштабное сравнение эффективности селекции с использованием как традиционного, так и мутированного фага-помощника.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Антигены и иммунизация верблюда

В качестве антигенов для иммунизации верблюда использовали препарат вируса бешенства и синтезированный в бактериальной экспрессионной системе рекомбинантный белок, соответствующий летальному фактору сибирской язвы (*Bacillus anthracis*). Летальный фактор любезно предоставлен А. Колесниковым из лаборатории биокатализа Института биоорганической химии РАН. Для получения препарата вируса бешенства использовали произведенную на биофабрике в г. Покрове Владимирской области антирабическую вакцину на основе инактивированного специального аттенуированного (ослабленного) штамма РВ 71/10 вируса бешенства. Этот препарат любезно предоставлен проф. Б.С. Народицким из Научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии РАМН. Препарат вируса бешенства дополнительно очищали от белков культуральной среды с помощью ультрафильтрации через мембрану, пропускающую молекулы и частицы размером менее 300 кДа (Vivaspin 20 ml Concentrator, VS 2051, Vivascience, USA) и задерживающую вирусные частицы, имеющие существенно больший размер. Параллельно препарат вируса концентрировали (примерно до  $10^7$  инфекционных частиц в 10 мл стандартного солевого раствора PBS). Полученный препарат разделяли на шесть равных частей и замораживали для хранения при  $-70^{\circ}\text{C}$  (пять частей – для пяти последовательных инъекций (им-

мунизация), еще одна часть – для селекции и анализа заданных мини-антител). Перед проведением каждого этапа иммунизации одну из хранящихся при  $-70^{\circ}\text{C}$  аликвот препарата размораживали, добавляли 650 мкг летального фактора сибирской язвы и смешивали в равных пропорциях с адъювантом Фрейнда. Таким образом была проведена пятиэтапная процедура иммунизации двугорбого верблюда *Camelus bactrianus* (самка 6 лет) смесью двух указанных выше препаратов (антигенов), смешанных в равных пропорциях с адъювантом Фрейнда (полным – только при первой инъекции, затем 4 раза – с неполным). Вторую инъекцию проводили через 4 недели после первой, а последующие три инъекции – через 10 дней, одна после другой. Взятие крови производили через 5 дней после последней инъекции.

### Получение библиотеки нуклеотидных последовательностей наноантител

По традиционной схеме (выделение РНК, синтез кДНК, двухстадийная ПЦР со специфическими праймерами, рестрикция и очистка вставок, встраивание вставок в фагмидный вектор [11–14]) осуществлено клонирование ДНК всего репертуара переменных доменов особых одноцепочечных антител из В-лимфоцитов периферической крови иммунизированного верблюда. В результате получили новую специфически обогащенную библиотеку нуклеотидных последовательностей мини-антител в фагмидном векторе рHEN4 [11]. Следует отметить, что эта библиотека состояла из двух подбиблиотек, различающихся сайтами узнавания рестрикционных эндонуклеаз используемых для встраивания последовательностей, кодирующих антиген-узнающие домены, в фагмидный вектор: а) NcoI + NotI и б) PstI + NotI. Рекомбинантными плазмидными ДНК, полученными в результате лигирования двух подбиблиотек вставок и двух соответствующих векторных последовательностей, методом электропорации трансформировали клетки *Escherichia coli* (штамм TG1). Стандартные процедуры клонирования, работы с бактериями и бактериофагом M13 проводили как описано ранее [15, 16]. «Базовая библиотека наноантител иммунизированного верблюда» вполне соответствовала предъявляемым требованиям ( $\sim 10^7$  клонов, процент вставок ожидаемого размера – около 80%). Она была использована для отбора искомым наноантител.

### Селекция наноантител методом фагового дисплея

Селекцию (паннинг) верблюжьих мини-антител (наноантител) методом фагового дисплея, а также наработку наноантител в периплазме бактерий и анализ способности наработанных наноантител узнавать заданный антиген проводили, как описано ранее [11–

14], с указанными ниже модификациями. Использовали (на стадии селекции и для ИФА) полистирольные иммунологические плашки с высокой сорбцией MICROLON 600 (Greiner Bio-One). Для блокировки применяли 5% обезжиренное молоко (Bio-Rad) или 1% БСА (Sigma-Aldrich) в стандартном солевом растворе (PBS). Рабочая концентрация ампициллина – 100 мкг/мл, канамицина – 70 мкг/мл.

В работе использовали штамм *E. coli* K12 / TG1 {*supE thi-1 (lac-proAB) (mcrB-hsdSM)5(rK- mK-)* [*F' traD36 proAB lacIqZ M15*]} (Stratagene) и штамм *E. coli* K12 / WK6 { $\Delta$ (*lac-pro*), *galE*, *strA*, *nal*; *F' lacIq ZM15, pro+*} [17], а также бактериофаг M13KO7 ([18], New England Biolabs) и фагмиду рHEN4 [11]. Штаммы *E. coli* и фагмида получены от проф. С. Муилдерманса (S. Muyldermans, Vrije Universiteit Brussel, Belgium). Модифицированный бактериофаг hp $\Delta$ MBpIII получен нами ранее [10] путем вырезания участка между сайтами MspAI (1634 п.н.) и BamHI (2221 п.н.) из геномной ДНК бактериофага M13KO7. Для наработки фага-помощника, соответствующего мутантному бактериофагу, проводили двухэтапную последовательную трансформацию клеток *E. coli* (штамм TG1). На первом этапе клетки трансформировали мутированной плазмидной ДНК рHEN4 $\Delta$ f1ori, из которой удален участок начала репликации нитчатого фага f1 (между сайтами EcoRI (1650) и Alw44I (2345)). Такая делеция приводит к тому, что плаزمида сохраняет способность к репликации как двухцепочечная ДНК (в ее составе остается соответствующий участок начала репликации), однако она теряет способность фагмиды к одноцепочечной репликации и уже не может упаковываться в фаговую частицу. На втором этапе клетки, содержащие рHEN4 $\Delta$ f1ori и, как следствие, устойчивые к ампициллину, трансформировали мутантной геномной ДНК (hp $\Delta$ MBpIII) бактериофага M13KO7 (двухцепочечной репликативной формой), содержащей ген устойчивости к канамицину. Затем клетки растили на среде, содержащей оба упомянутых антибиотика. Для наработки модифицированного фага-помощника использовали одну из выросших колоний клеток. Фаг наращивали в течение ночи в среде с канамицином и 1 мМ изопропил- $\beta$ -D-1-тиогаляктопиранозидом (для активации синтеза белка gIII дикого типа, кодируемого рHEN4). Затем фаг очищали традиционным методом осаждения с полиэтиленгликолем [15, 16]. В результате получали модифицированный фаг, который способен эффективно заражать бактериальные клетки. Однако его геномная ДНК кодирует только мутантный белок gIII, что обеспечивает потерю дочерними фагами способности заражать клетки бактерий в отсутствие дополнительной плазмиды, кодирующей или gIII дикого типа, или gIII со встроенной последовательностью мини-антитела.

Селекцию (из одной и той же исходной библиотеки) наноантител, связывающихся с препаратом вируса бешенства, проводили параллельно двумя способами. В первом варианте использовали традиционный метод фагового дисплея с фагом-помощником M13KO7. В этом случае было проведено три цикла селекции/амплификации. В первом цикле в качестве блокирующего агента использовали 5% обезжиренное молоко (Bio-Rad Laboratories, США) в PBS, во втором – 1% БСА (Amresco, США) в PBS, в третьем – снова 5% молоко. Из внесенных в лунку с антигеном  $\sim 10^{11}$  фаговых частиц исходной библиотеки после инкубации и отмывки в элюате в активном виде сохранились  $\sim 10^6$  фаговых частиц, на втором этапе из  $\sim 10^{11}$  фаговых частиц сохранились  $\sim 10^7$  фаговых частиц, т.е. в  $\sim 10$  раз больше, чем после первого этапа селекции. В результате третьего этапа после инкубации и отмывки в активном виде в элюате сохранились  $\sim 10^8$  фаговых частиц, т.е. титр частиц заметно вырос по сравнению с предыдущим этапом. Это обычно свидетельствует о хорошем прохождении селекции и размножении специфически связывающихся фаговых частиц с экспонированными на их поверхности мини-антителами, которые, предположительно, и должны отвечать за это специфическое связывание. После последней элюции и нейтрализации раствор с фаговыми частицами в различных разведениях использовали для заражения клеток *E. coli* (штамм WK6), чтобы получить на чашке Петри отстоящие друг от друга колонии для финального анализа.

Параллельно с традиционной процедурой из той же исходной библиотеки проводили селекцию наноантител, связывающихся с препаратом вируса бешенства или с летальным фактором сибирской язвы, с помощью мутированного фага-помощника hrΔMBvIII с N-концевой делецией в поверхностном белке gIII [10]. Селекцию проводили аналогично описанной процедуре для традиционного фага-помощника. Следует отметить, что число вырастающих после каждого этапа селекции колоний (соответствует числу активных фаговых частиц с наноантителами) в этом случае было существенно меньшим (в 100 раз меньше после первого этапа и в 10 раз – после второго этапа селекции), чем в случае обычного фага-помощника. Модифицированный фаг-помощник был явно менее надежен для последующего заражения бактерий и амплификации элюированных фаговых частиц, что иногда отражалось в потере отбираемых клонов. Заражение клеток штамма WK6 такими модифицированными фагами после элюции, по-видимому, особенно малоэффективно (практически невозможно), поэтому для заражения элюированными фаговыми частицами, в том числе и после финальной селекции, использовали только клетки *E. coli* штамма TG1.

Периплазматический экстракт, содержащий мини-антитело с НА-тагом на С-конце, применяли для оценки специфичности и эффективности связывания наноантитела с препаратом иммобилизованного в иммунологической плашке антигена с помощью традиционного ИФА [13, 14]. В качестве вторичных антител к НА-тагу использовали конъюгированные с пероксидазой хрена анти-НА-моноклональные антитела (CHGT-45P-Z, ICL, Inc., США). Активность пероксидазы хрена определяли, используя в качестве хромогенного субстрата ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат). Оптическую плотность измеряли при длине волны 405 нм с помощью планшетного флуориметра. Контрольные лунки не содержали антиген, но далее были блокированы и процессированы параллельно с экспериментальными ячейками (с антигеном). Число знаков «+» в графе «ИФА-сигнал» в табл. 1 и 2 коррелирует с относительной величиной поглощения в ИФА (суммарной эффективностью экспрессии/доступности и связывания наноантитела из периплазматического экстракта с иммобилизованным в лунке антигеном).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Метод NMR-анализа клонированных нуклеотидных последовательностей наноантител

Для промежуточного анализа отбираемых клонов мини-антител обычно используют ПЦР-амплификацию (непосредственно на материале отдельной колонии) нуклеотидной последовательности, кодирующей мини-антитело, с небольшими прилегающими участками фагамиды pHEN4, которая используется в качестве векторной. Получаемый ПЦР-продукт затем обрабатывают частощепающей рестрикционной эндонуклеазой (рестриктазой), как правило, HinfI. Последовательности, кодирующие наноантитела, имеют как относительно консервативные участки, содержащие «консервативные» сайты узнавания HinfI, так и достаточно протяженные гипервариабельные участки (из трех таких участков особенно протяженный третий, CDR3). В этих гипервариабельных участках заметно варьируют число и местоположение сайтов, узнаваемых частощепающими рестриктазами. Соответственно заметно варьируют число и размеры получающихся в результате расщепления фрагментов ДНК. Нами установлено, что для идентификации конкретного клона (варианта последовательности мини-антитела) значительно более надежно использовать параллельное расщепление ПЦР-продукта тремя различными рестриктазами (HinfI, MspI, RsaI).

В качестве праймеров для ПЦР-амплификации клонированной последовательности, кодирующей наноантитело, с небольшими прилегающими участками

Рис. 1. Данные НМР-анализа («НМР-фингерпринты») клонов исходной, полученной нами в результате иммунизации и последующего клонирования библиотеки мини-антител. Отобраны и проанализированы 94 клон. Выявлено 85 различных фингерпринтов, и только 9 из них, обозначенные на рисунке как (2х), повторяются в данной выборке. Основная часть фингерпринтов соответствует клону, в которых встраивание последовательности, кодирующей наноантитело, в вектор проводилось по сайтам PstI–NotI. Меньшая часть фингерпринтов, обозначенных латинской буквой N, соответствует клонам, в которых встраивание последовательности наноантитела в вектор проводилось по сайтам NcoI–NotI. Подчеркиванием выделены варианты фингерпринтов, встретившиеся в каждой из двух подбиблиотек. Каждый фингерпринт представляет собой электрофореграмму, включающую (слева направо) три дорожки геля с разделенными ДНК после обработки ПЦР-продукта (последовательности наноантитела анализируемого клона) соответственно рестриктазами HinfI (H), MspI (M) или RsaI (R) и четвертую дорожку – с маркерной ДНК (размеры маркерных ДНК (п.о.) показаны в нижней части рисунка).

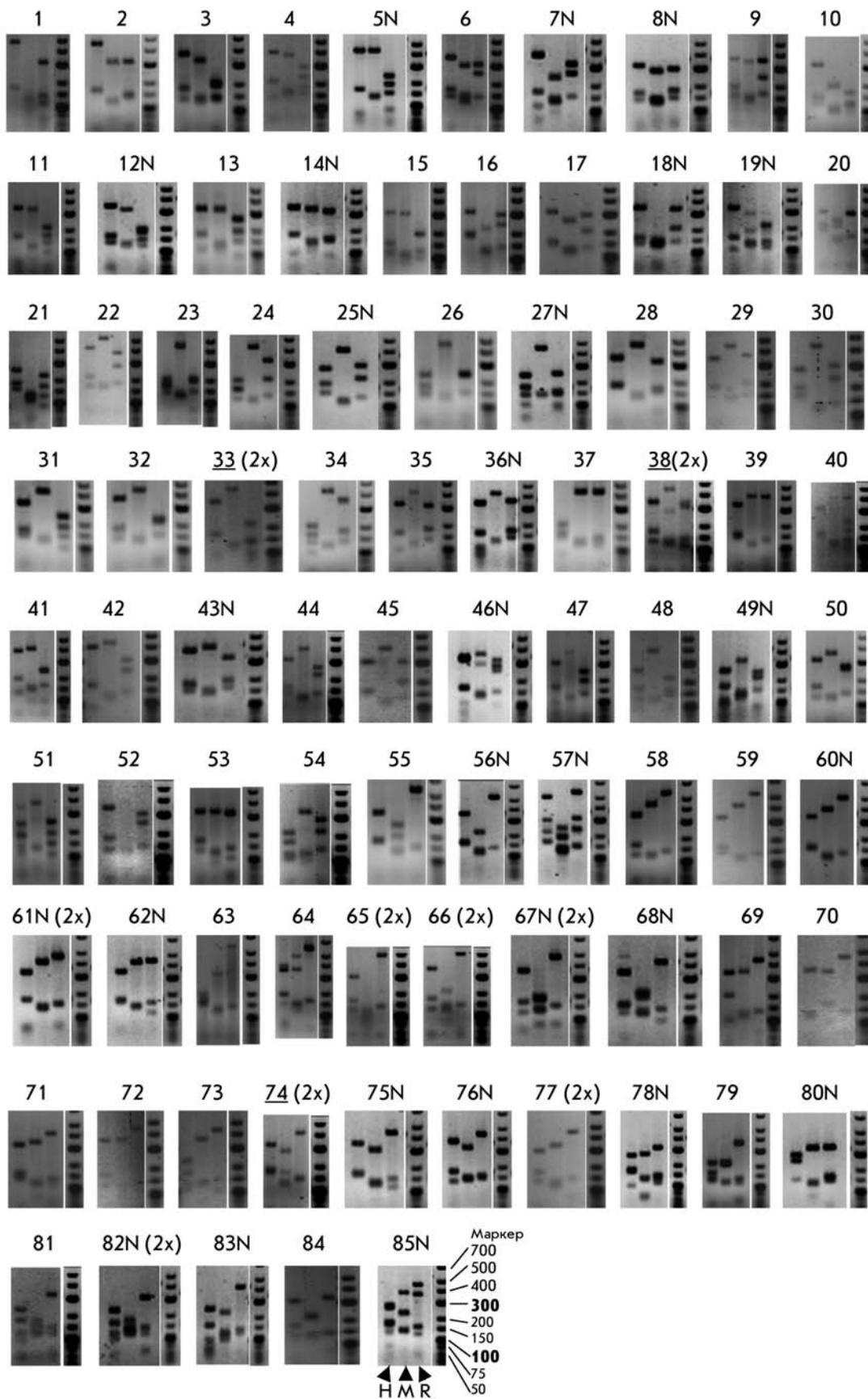


Таблица 1. Относительная представленность различных вариантов фингерпринтов отобранных клонов наноантител, узнающих летальный фактор сибирской язвы (alf), на различных этапах их селекции

Номер клона (alf №)	1 этап Норм. фаг-пом.	1 этап Мут. фаг-пом.	2 этап Норм. фаг-пом.	2 этап Мут. фаг-пом.	3 этап Норм. фаг-пом.	3 этап Мут. фаг-пом.	ИФА-сигнал
1	3/28	0/27	3/30	0/43	3/42	5/43	++
2	0/28	1/27	3/30	0/43	0/42	0/43	+++
3	1/28	0/27	0/30	0/43	3/42	3/43	++
4	2/28	0/27	0/30	0/43	1/42	0/43	+
5	2/28	0/27	0/30	1/43	0/42	1/43	+
6	3/28	0/27	12/30	0/43	12/42	13/43	++
7	0/28	0/27	0/30	0/43	0/42	1/43	+++
8	0/28	0/27	0/30	0/43	0/42	2/43	++
9	1/28	0/27	0/30	1/43	1/42	1/43	++
10	1/28	0/27	3/30	0/43	2/42	1/43	+++
11	0/28	0/27	0/30	0/43	0/42	1/43	++
12	0/28	0/27	0/30	0/43	1/42	1/43	++
13	1/28	0/27	2/30	0/43	6/42	2/43	++
14	0/28	0/27	2/30	1/43	2/42	2/43	+++

Примечание. Здесь и в табл. 2 жирным шрифтом выделены варианты клонов, которые использовали для наработки и анализа (ИФА) соответствующих наноантител. Количество знаков «+» коррелирует с относительным усилением сигнала (величиной поглощения) в ИФА. «Норм. фаг-пом.» – селекция с обычным фагом-помощником. «Мут. фаг-пом.» – селекция с мутантным фагом-помощником.

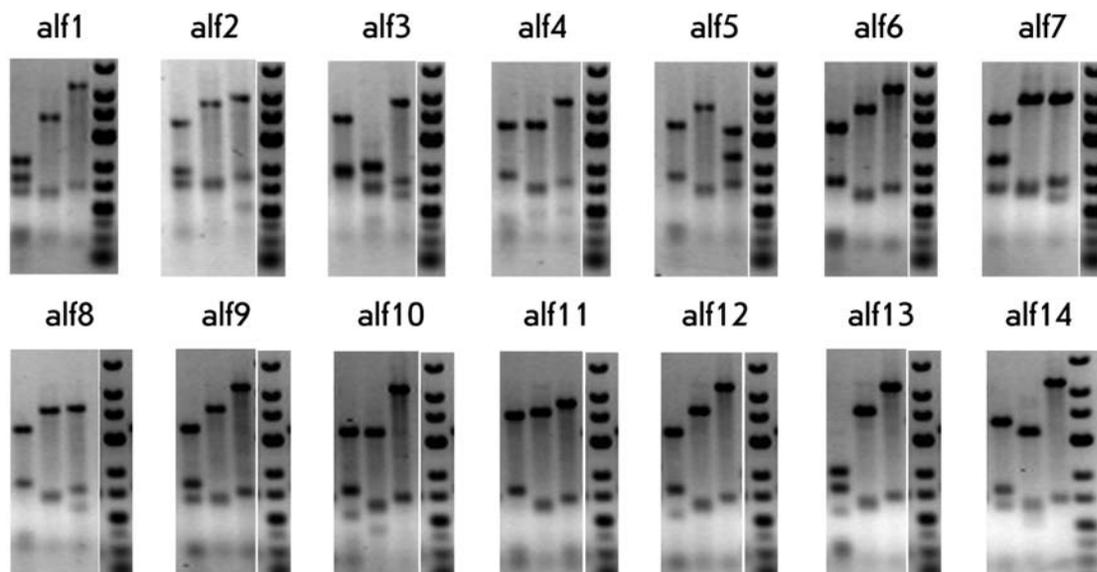


Рис. 2. НМР-фингерпринты отобранных клонов наноантител, связывающихся при иммуноферментном анализе с иммобилизованным препаратом летального фактора *Bacillus anthracis*. Эти клоны обозначены как «alf» с соответствующим порядковым номером.

фагмиды рНЕН4 в данной работе использованы прямой праймер RP (5'-cacacaggaacagctatgac-3') и обратный праймер GIII (5'-ccacagacagcctcatag-3'). После проведения ПЦР в объеме 20 мкл реакционную смесь равномерно распределяли по трем пробиркам (по 6 мкл), в которых затем параллельно (в объеме 15 мкл) расщепляли ПЦР-продукт одной из трех рестриктаз: HinfI (Fermentas, Литва), MspI (Fermentas, Литва) и RsaI (СибЭнзим, Россия). Три варианта гидролизата наносили в соседние ячейки 2.5–3% агарозного геля и подвергали электрофоретическому фракционированию. В качестве маркеров размера фрагментов ДНК использовали смесь «low range» фирмы «Fermentas». Электрофореграмма (три дорожки геля с ДНК после

обработки соответственно рестриктазами HinfI, MspI или RsaI плюс четвертая дорожка – с маркерными ДНК) – надежный опознавательный фингерпринт-подобный образ («фингерпринт») данного варианта клонированной в фагмиде рНЕН4 последовательности, кодирующей мини-антитело. Такой метод расширенного фингерпринтного анализа (способа идентификации отдельного варианта клонированной последовательности мини-антитела) мы назвали «НМР-анализом». Именно с помощью НМР-анализа мы исследовали результаты процедур селекции (отбираемые на разных стадиях клоны мини-антител).

На рис. 1 представлены данные НМР-анализа выборочных (предположительно, наиболее часто пред-

Таблица 2. Относительная представленность различных вариантов фингерпринтов отобранных клонов наноантител, узнающих препарат вируса бешенства (aRv), на различных этапах их селекции

Номер клона (aRv №)	2 этап Нормальный фаг-помощник	2 этап Мутантный фаг-помощник	3 этап Нормальный фаг-помощник	3 этап Мутантный фаг-помощник	ИФА-сигнал
1	0/67	3/45	1/30	2/58	+
2	7/67	1/45	5/30	2/58	+
3	13/67	0/45	8/30	11/58	++
4	0/67	0/45	2/30	0/58	+++
5	4/67	1/45	1/30	0/58	+
6	0/67	0/45	1/30	0/58	+
7	0/67	0/45	0/30	1/58	+++
8	2/67	0/45	0/30	0/58	+
9	1/67	1/45	0/30	0/58	+
10	1/67	0/45	0/30	0/58	+
11	1/67	0/45	0/30	0/58	++
12	2/67	0/45	0/30	0/58	+++
13	4/67	0/45	0/30	2/58	++
14	0/67	2/45	0/30	0/58	++
15	1/67	0/45	0/30	0/58	+
16	1/67	0/45	0/30	0/58	+++
17	3/67	1/45	2/30	1/58	++

ставленных) клонов исходной, полученной нами в результате иммунизации и последующего клонирования библиотеки мини-антител. Отобраны и проанализированы все 94 клона, выросшие при разведении  $10^{-5}$  базовой библиотеки, исходно состоящей из двух подбиблиотек. Выявлено 85 различных фингерпринтов, и только 9 из них повторяются дважды (2х) в данной выборке, т.е. библиотека получилась на удивление весьма разнородная, без доминирования отдельных последовательностей. Основная часть фингерпринтов (61) соответствует клонам, в которых последовательности, кодирующие наноантитело, встраивали в вектор по сайтам PstI–NotI. Меньшая часть фингерпринтов (33), обозначенных латинской буквой N, соответствует клонам, в которых последовательности, кодирующие наноантитело, встраивали в вектор по сайтам NcoI–NotI. Подчеркнуты варианты очень похожих фингерпринтов, встретившихся в каждой из двух подбиблиотек. Из *рис. 1* видно, что параллельное использование трех рестриктаз вместо одной позволяет выявить различия в значительно большем числе клонов. Так, например, при использовании только HinfI мы не смогли бы различить следующие группы клонов: 1) 3, 38, 52, 53 и 66; 2) 55, 56N, 60N, 62N, 74 и 75N. Также существенно меньше вариантов можно различить, если применять только одну из двух других рестриктаз, MspI и RsaI.

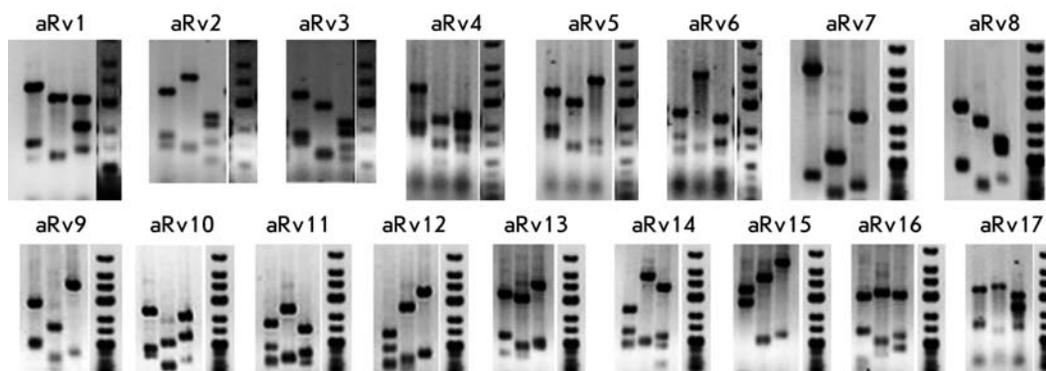
Полученный результат свидетельствует о достаточно большом разнообразии клонов в исходной библиотеке и о высокой разрешающей силе NMR-анализа. Следует заметить, что при использовании только одной рестриктазы (любой из трех – HinfI, MspI, RsaI) разнообразие фингерпринтов будет заметно меньшим и существенно менее надежным, поэ-

тому мы сочли принципиальным применение именно полной версии NMR-анализа и на всех последующих стадиях анализа отбираемых клонов мини-антител.

Алгоритм отбора наноантител был следующим. С помощью NMR-анализа анализировали выборку из наиболее представленных отбираемых клонов (всех клонов, вырастающих на чашке Петри при наибольшем разведении библиотеки или элюированных фаговых частиц, при котором выростали по крайней мере 24 колонии). Все клоны с уникальным фингерпринтом использовали для наработки соответствующего наноантитела в периплазме бактерии хозяина. Периплазматические экстракты затем проверяли с помощью ИФА (ELISA) на наличие наноантитела, связывающего заданный антиген. В качестве антигенов для процедур селекции и ИФА применяли те же препараты вируса бешенства или летального фактора сибирской язвы, что и для иммунизации верблюда. Увеличение оптической плотности в ячейках иммунологической плашки отражало сумму двух процессов: степени экспрессии/доступности соответствующего наноантитела и силу его взаимодействия с иммобилизованным антигеном. На *рис. 2* и *3*, а также в соответствующих им *табл. 1* и *2* приведены данные о селекции именно финально отобранных искомым клонов наноантител, связывающих заданный антиген.

При обсуждении результатов следует аккуратно интерпретировать данные. Нельзя исключить возможность сходства фингерпринтов у некоторых различающихся по нуклеотидной и аминокислотной последовательности клонов, особенно при сравнении отобранных клонов со случайными клонами исходной библиотеки. Конечно же, более полную информацию дает секвенирование. Однако наш эксперименталь-

**Рис. 3.** НМР-фингерпринты отобранных клонов наноантител, связывающихся при иммуноферментном анализе с иммобилизованным препаратом вируса бешенства. Эти клоны обозначены как «aRv» с соответствующим порядковым номером.



ный опыт показывает, что в подавляющем числе случаев при идентификации клона НМР-анализ вполне может заменить секвенирование и на сегодняшний день представляется более экономичным методом.

### НМР-анализ селекции наноантител, узнающих летальный фактор сибирской язвы

На рис. 2 представлены НМР-фингерпринты 14 вариантов отобранных клонов наноантител (alf), узнающих летальный фактор сибирской язвы. Только для пяти из них можно найти похожий фингерпринт среди 85 вариантов в исходной библиотеке: для alf3 – 68N, alf6 – 59, alf8 – 62N, alf9 – 58, alf10 – 64. Да и среди этих пяти вариантов сходство не обязательно означает идентичность. Так, вариант фингерпринта клона alf8 не выявлялся среди 28–30 проанализированных клонов после первого и второго раундов селекции, появлялся только после третьего раунда селекции и лишь в случае применения мутантного фага-помощника. С другой стороны, вариант фингерпринта клона alf6 вполне может соответствовать одному из наиболее представленных вариантов в исходной иммунной библиотеке наноантител, так как этот вариант остается наиболее представленным в ходе всех раундов селекции.

Здесь следует отметить один довольно неожиданный феномен, связанный с модифицированным методом селекции с использованием фага-помощника hrΔMBpIII.

При отборе наноантител к каждому из двух антигенов (табл. 1 и 2) в ходе первых двух этапов селекции заметно обогащались специфические варианты клонов, отличные как от тех 85, что представлены на рис. 1, так и от тех, которые обогащались при использовании традиционного фага-помощника. К сожалению, кодируемые этими клонами наноантитела в ИФА не связывали собственно заданные антигены. Эти клоны эффективно отсеивались на последующих этапах селекции. Мы предполагаем, что эти временно отбираемые клоны связываются с блокирующим агентом и впоследствии отсеиваются при его замене. По-

видимому, некоторые наноантитела, более доступные на поверхности мутантного фага, могут связываться или с компонентом обезжиренного молока (на первом этапе селекции), или с БСА (во время второго этапа селекции). На третьем же этапе, когда для блокировки снова использовали обезжиренное молоко, при селекции с мутантным фагом происходило резкое «прочищение» неспецифического фона. Исчезали неспецифические клоны, обогащавшиеся на первом и втором этапах селекции, и проявлялись фингерпринты специфических искомым клонов, многие из которых были идентичны клонам, отбираемым параллельно традиционным методом (табл. 1, клоны alf1, alf3, alf6, alf9, alf10, alf12, alf13, alf14). Любопытно, что, как и в предыдущей нашей работе [11], некоторые варианты наноантител удалось отобрать только с помощью модифицированной процедуры селекции (табл. 1, клоны alf5, alf7, alf8, alf11). Есть и варианты, отбираемые только с помощью традиционной процедуры (alf2-клон после второго этапа селекции, alf4). Интересно, что клоны наноантител, дающие наибольший сигнал в ИФА, не обязательно наиболее представлены среди отбираемых клонов и могут даже теряться в ходе последующих раундов селекции (alf2). Особенно сильно после трех раундов селекции обогащались клоны, дающие в ИФА сигнал средней силы.

### НМР-анализ селекции наноантител, узнающих препарат вируса бешенства

Любопытно, что сделанные выше заключения подтвердились и при селекции наноантител (aRv), узнающих препарат вируса бешенства (рис. 3, табл. 2).

В этом случае также только для пяти из 17 финально отобранных клонов можно найти похожий фингерпринт среди 85 вариантов в исходной библиотеке: для aRv2 – 32, aRv3 – 12N, aRv5 – 75N, aRv13 – 76N, aRv17 – 46N. Вариант фингерпринта клона aRv3 вполне может соответствовать одному из наиболее представленных вариантов в исходной иммунной библиотеке наноантител, так как этот вариант остается также наиболее представленным в ходе всех раундов селек-

ции с нормальным фагом-помощником. Анализ селекции этого фингерпринтного варианта при использовании мутантного фага-помощника позволяет особенно четко увидеть тот же, что и в предыдущем случае, эффект «прочищения неспецифического фона» в результате трех раундов селекции с изменением блокирующего агента. Как в рассмотренном ранее случае отбора наноантител, узнающих летальный фактор сибирской язвы, так и в данном случае параллельное использование традиционного и модифицированного методов селекции (разных фагов-помощников) позволяет отобрать большее разнообразие клонов наноантител. Так, только при традиционной селекции отобраны варианты фингерпринтов, соответствующих клонам aRv4, aRv6, aRv8, aRv10, aRv11, aRv12, aRv15 и aRv16. И только при использовании модифицированной процедуры отобраны варианты aRv7, aRv13 и aRv14. Вариант aRv13 был отобран и с помощью традиционной процедуры в результате двух этапов селекции, но затем утерян в ходе третьего этапа.

Интересно, что и в этом случае клоны наноантител, дающих наибольший сигнал в ИФА, не принадлежали к наиболее представленным среди отобранных клонов. Клоны aRv4, aRv7, aRv12 и aRv16 были отобраны в небольшом числе и только одним из двух методов селекции. При переходе от второго к третьему этапу селекции некоторые из этих клонов (aRv12, aRv16) легко могут быть утеряны.

## ВЫВОДЫ

Для повышения эффективности селекции наноантител с заданной специфичностью, основанной на методе фагового дисплея, можно рекомендовать применение параллельной селекции с использованием как традиционного фага-помощника, так и модифицированного фага-помощника с N-концевой делецией в поверхностном белке gIII. В модифицированной процедуре

следует учитывать более высокий неспецифический фон, который, по-видимому, связан с отбором фаговых частиц, содержащих наноантитела, связывающиеся с блокирующим агентом или иным неспецифическим компонентом в иммунологической плашке. Нельзя исключить и специфического связывания с антигеном, которое происходит только когда наноантитело экспонировано на поверхности фага и пропадает при переходе к собственно свободному наноантителу. Последовательное применение различных блокирующих агентов позволяет в ходе трех раундов селекции сильно уменьшить неспецифический фон в случае использования предложенного мутантного фага-помощника. Следует учитывать тот факт, что искомые наноантитела с особо привлекательными характеристиками могут теряться на дополнительных этапах амплификации/селекции. Мы можем рекомендовать проводить анализ отбираемых клонов после второго и третьего этапов селекции в традиционной методике и сразу после третьего этапа селекции в случае модифицированного метода. По нашим данным хорошие результаты дает также использование модифицированного метода после начального традиционного этапа селекции. ●

*Работа поддержана Министерством образования и науки РФ (ГК № 02.512.11.2320), а также Программой Президиума РАН № 27 «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов» (3.1.2.). Авторы благодарны проф. С. Муилдермансу (S. Muyltermans, Vrije Universiteit Brussel, Belgium) за предоставление фагмиды pHEN4 и штаммов E. coli TG1 и WK6, а также М.В. Рutowской и сотрудникам научно-экспериментальной базы «Черноголовка» ИПЭЭ имени А.Н. Северцова РАН за помощь в содержании и иммунизации верблюда.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brissette R., Goldstein N.I. // *Methods Mol. Biol.* 2007. V. 383. P. 203–213.
2. Sidhu S.S., Koide S. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2007. V. 17. № 4. P. 481–487.
3. Hoogenboom H.R. // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23. № 9. P. 1105–1116.
4. Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyltermans S., et al. // *Nature.* 1993. V. 363. P. 446–448.
5. Ghassabeh G.H., Muyltermans S., Saerens D. // *Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing* / Eds Shire S.J., et al. New York: Springer, 2010. P. 29–48.
6. Деев С.М., Лебедев Е.Н. // *Acta Naturae.* 2009. T. 1. № 1. P. 32–50.
7. Vincke C., Loris R., Saerens D., et al. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 5. P. 3273–3284.
8. Wesolowski J., Alzogaray V., Reyelt J., et al. // *Med. Microbiol. Immunol.* 2009. P. 157–174.
9. Muyltermans S., Baral T.N., Retamozzo V.C., et al. // *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2009. V. 128. P. 178–183.
10. Вятчанин А.С., Тиллиб С.В. // *Биотехнология.* 2008. № 4. С. 32–34.
11. Ghahroudi M.A., Desmyter A., Wyns L., et al. // *FEBS Lett.* 1997. V. 414. P. 521–526.
12. Nguyen V.K., Desmyter A., Muyltermans S. // *Adv. Immunol.* 2001. V. 79. P. 261–296.
13. Conrath K.E., Lauwereys M., Galleni M., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001. V. 45. P. 2807–2812.
14. Saerens D., Kinne J., Bosmans E., et al. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 51965–51972.
15. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Edn. 2. Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
16. Barbas III C.F., Burton D.R., Scott J.K., Silverman G.J. *Phage Display: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
17. Zell R., Fritz H.J. // *EMBO J.* 1987. V. 6. P. 1809–1815.
18. Vieira J., Messing J. // *Methods Enzymol.* 1987. V. 153. P. 3–11.