

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Альтшулер Евгений Петрович

**ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНЫХ
ФРАГМЕНТОВ АНТИТЕЛА, СПЕЦИФИЧНОГО К СЕРДЕЧНОЙ ИЗОФОРМЕ
ТРОПОНИНА I**

03.01.04 - биохимия

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Москва – 2012

Работа выполнена на кафедре биохимии Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Научный руководитель: доктор биологических наук
Катруха Алексей Генрихович

Официальные оппоненты:

Глухов Александр Иванович

доктор биологических наук, профессор, Курчатовский центр нано-, бионаук, информационных и конвергентных технологий с источниками синхротронного излучения и нейтронов и социогуманитарных наук Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский Институт», заведующий лабораторией молекулярных основ онкогенеза.

Бирх Клара Рудольфовна

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Ведущая организация: Институт экспериментальной кардиологии Федерального государственного учреждения «Российский кардиологический производственный комплекс» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации.

Защита состоится 10 декабря 2012 года в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета Д 501.001.71 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, д. 1, стр. 12, аудитория 389.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан «_____» ноября 2012 года

Ученый секретарь
диссертационного совета

Медведева Марина Валерьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Сердечно-сосудистые заболевания остаются главной причиной высокой смертности в России и других индустриально-развитых странах. Они являются одними из наиболее распространенных и наиболее опасных заболеваний в мире. Изоформа тропонина I из сердца человека (hcTnI) представляет собой наиболее ранний и специфический маркер повреждения кардиомиоцитов, сопровождающего такие серьезные сердечно-сосудистые заболевания, как инфаркт миокарда и нестабильная стенокардия. Кроме того, повышение уровня тропонина I в крови используется для оценки риска осложнений с острым коронарным синдромом и оптимизации лечебных мероприятий.

Иммунохимические методы определения белковых маркеров различных заболеваний являются важным диагностическим инструментом. Моноклональное антитело 19C7 (MAт 19C7) с высокой аффинностью и специфичностью распознает hcTnI и может быть использовано для создания многих систем диагностики инфаркта миокарда, основанных на определении концентрации hcTnI в крови.

Альтернативным методом получения антител является создание их рекомбинантных аналогов. Этот подход позволяет получать высокоочищенные препараты рекомбинантных антител, а также изменять их свойства с помощью генно-инженерных методов. Для этого используют различные виды мутагенеза, такие как создание ограниченного количества мутантных форм на основе структуры комплекса антитела с антигеном, либо создание больших библиотек мутантных форм, из которых в ходе дальнейшей работы отбирают варианты с улучшенными свойствами. К таким модификациям можно отнести повышение аффинности, увеличение числа антиген-связывающих участков, изменение состава доменов, пространственной ориентации участков связывания с антигеном, молекулярного веса, изоэлектрической точки и потенциальной иммуногенности.

В данной работе проведено сравнение свойств рекомбинантных фрагментов MAт 19C7 со свойствами исходного полноразмерного антитела. Также на основе рекомбинантных фрагментов были созданы различные мутантные формы с целью увеличения аффинности их взаимодействия с антигеном. Для анализа влияния отдельных мутаций на аффинность рекомбинантных антител был проведен сравнительный анализ иммунохимических свойств полученных мутантных форм.

Цель и задачи работы. Основной целью данного исследования было сравнение рекомбинантных scFv и Fab-фрагментов моноклонального антитела 19C7 и их модификация путем мутагенеза антигенсвязывающих участков для увеличения их аффинности и совершенствования системы детекции hсTnI в крови.

В работе решались следующие задачи:

1. Определить нуклеотидную последовательность генов, кодирующих цепи Fab-фрагмента МАт 19С7, создать на ее основе молекулярно-генетические конструкции для экспрессии рекомбинантных scFv и Fab-фрагментов МАт 19С7 и осуществить получение рекомбинантных scFv и Fab-фрагментов МАт 19С7.
2. Сравнить иммунохимические свойства рекомбинантных фрагментов МАт 19С7 и исходного антитела, а также результаты, получаемые при их использовании для измерения концентрации hсTnI в сыворотках больных с диагностированным острым инфарктом миокарда.
3. Определить аминокислотные остатки scFv-фрагментов МАт 19С7, модификация которых может привести к увеличению аффинности, провести моделирование *in silico* влияния отдельных мутаций на аффинность, выбрать мутантные формы для экспериментального анализа.
4. Охарактеризовать отобранные в результате *in silico* моделирования scFv-фрагменты и сравнить их с scFv-фрагментами МАт 19С7 дикого типа.
5. Создать библиотеку фаговых частиц, несущих на поверхности мутированные в заданном участке последовательности scFv-фрагменты МАт 19С7 и осуществить отбор мутированных вариантов scFv-фрагментов МАт 19С7 методом фагового дисплея при разных условиях.
6. Охарактеризовать отобранные методом фагового дисплея мутантные scFv-фрагменты и сравнить их с scFv-фрагментами МАт 19С7 дикого типа.

Научная новизна и практическая ценность работы. В настоящей работе впервые получены рекомбинантные Fab и scFv-фрагменты МАт 19С7. Разработан протокол экспрессии, ренатурации, очистки. Методами иммуноферментного и флуороиммунного анализа, а также методом детекции поверхностного плазмонного резонанса показано, что иммунохимические свойства рекомбинантных фрагментов существенно не отличаются от свойств полноразмерного МАт 19С7. Использование полноразмерного МАт 19С7 и его рекомбинантных фрагментов в системах для детекции hсTnI дает сопоставимые результаты как при измерении концентрации hсTnI в калибровочных растворах, так и в сыворотках больных с диагностированным острым инфарктом миокарда. В ходе работы проведено увеличение аффинности рекомбинантных scFv-фрагментов МАт 19С7 такими

методами, как *in silico* мутагенез и экспериментальный отбор из библиотеки scFv-фрагментов, содержащих точечные мутации в участке CDR-H3, с использованием фагового дисплея. В результате сравнения иммунохимических свойств 18 отобранных мутантных форм найдено две, характеризующиеся повышенной аффинностью связывания антигена.

Апробация работы. Результаты работы были доложены на заседании кафедры биохимии Биологического факультета МГУ, на 37-м конгрессе Союза Европейских Биохимических Сообществ и 22-м конгрессе Международного Объединения Биохимии и Молекулярной биологии в 2012 году (Севилья, Испания); на Международной конференции «Фармацевтические и медицинские биотехнологии» в 2012 году (Москва, Россия), а также на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» в 2009 году (Москва, Россия).

Публикации. По теме диссертации было опубликовано 5 печатных работ, включая 2 статьи в профильных журналах.

Структура и объем работы. Диссертационная работа содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты работы и их обсуждение, выводы, список цитированной литературы. Работа изложена на 187 страницах печатного текста, иллюстрирована 60 рисунками и 1 таблицей. Список цитированной литературы содержит 268 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

В обзоре литературы приведены данные о строении, функциях, аффинном созревании, получении и практическом применении антител. Особое внимание уделяется получению рекомбинантных антител и методам модификации их последовательности с целью усовершенствования их свойств для практического применения.

Материалы и методы исследования

Материалы. Праймеры, используемые в работе, были синтезированы в компаниях Синтол (Россия) и ЗАО «Евроген» (Россия). Синтез генов с оптимизацией кодонного состава проводился в компании GenScript (США). Синтез библиотеки генов мутированных scFv-фрагментов проводился в компании MetGen (Финляндия). Секвенирование проводилось в ЦКП «Геном» и ЗАО «Евроген» (Россия). Пептид TnI88 (SASRKLQLKTC) был синтезирован в компании Анаспес (Дания).

Экспрессия рекомбинантных фрагментов. В работе мы использовали два

принципиально разных метода экспрессии рекомбинантных фрагментов в клетках *E.coli*. Один метод заключался в экспрессии рекомбинантных Fab-фрагментов, содержащих сигнальный пептид *relB*, в периплазматическом пространстве *E.coli*, характеризующейся образованием функционально активных Fab-фрагментов. При получении Fab-фрагментов этим методом проводилась коэкспрессия составляющих его полипептидных цепей – легкой цепи (ЛЦ) и фрагмента тяжелой цепи (фТЦ). Другой метод – экспрессия белка (ЛЦ или фТЦ или scFv) в неактивной агрегированной форме, обнаруживаемого во фракции телец включения (ТВ) и требующего ренатурации для восстановления антиген-связывающей активности. Экспрессию проводили в клетках *E.coli* штамма BL21(DE3)pLysS или Rosetta(DE3) в среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 34 мкг/мл хлорамфеникола, при температуре 37°C и перемешивании. Индукцию экспрессии проводили при оптической плотности (600 нм) 0.4-0.5 путем добавления к суспензии изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида (IPTG) до конечной концентрации 3 мМ и продолжали инкубацию при 37°C в течение 3 часов при перемешивании.

Выделение рекомбинантных фрагментов МАт 19С7. Бактериальную культуру *E.coli* после проведения экспрессии центрифугировали 30 мин при 4000 g при 4°C. Осадок бактерий лизировали в 25 мл буфера (50 мМ Трис-НСl pH 7.6, 150 мМ NaCl, 0.5 мМ PMSF, Тритон-Х100 2% по объему) путем обработки ультразвуком (Branson Digital Sonifier, Model 250), после чего промывали, используя аналогичный буфер, не содержащий Тритон Х-100. В зависимости от используемого метода выделение рекомбинантных фрагментов МАт 19С7 проводили либо из фракции осадка после лизиса клеток, либо из фракции супернатанта, либо из культуральной среды.

Ренатурация рекомбинантных фрагментов МАт 19С7. Осадки ТВ, содержащие ЛЦ или фТЦ МАт 19С7, промывали буфером 50 мМ Трис-НСl, pH 7.6, затем растворяли в 1 мл солюбилизирующего буфера (6 М гуанидинхлорид, 0.1 М аргинин, 2.5 мМ ЭДТА, 100 мМ Трис-НСl pH 8.0). Аликвоты суспензий солюбилизированных ТВ, содержащих эквимольные количества ЛЦ и фТЦ смешивали, а к смеси добавляли β-меркаптоэтанол до концентрации 50 мМ. После 1 часа инкубации при 37°C при перемешивании раствор восстановленных ЛЦ и фТЦ рекомбинантных Fab-фрагментов разбавляли ренатурирующим буфером, содержащим 6 М гуанидинхлорид, 0.1 М аргинин, 2.5 мМ ЭДТА, 100 мМ Трис-НСl pH 8.0, и 4 мМ окисленный глутатион, до суммарной концентрации ЛЦ и фТЦ 0.2 мг/мл и инкубировали в течение 24 часов при температуре 25°C и постоянном перемешивании. После этого раствор рекомбинантных Fab-фрагментов диализовали против 10-кратного объема буфера, содержащего 0.1 М аргинин,

2.5 мМ ЭДТА, 100 мМ, Трис-НСl рН 8.0 в течение 72 часов при 4°C, затем против буфера, содержащего 2.5 мМ ЭДТА, 100 мМ Трис-НСl рН 8 при 4°C в течение 24 часов, после чего переводили в буфер ФСБ (10 мМ КН₂РО₄, 150 мМ NaCl, рН 7.4) с 0.1% NaN₃, также при 4°C. Ренатурацию scFv-фрагментов проводили аналогично ренатурации рекомбинантных Fab-фрагментов, только с использованием ТВ scFv.

Аффинная очистка рекомбинантных фрагментов. Для очистки функционально-активных рекомбинантных фрагментов использовали метод хроматографии на аффинном носителе Sulfolink с иммобилизованным пептидом Tni88, последовательность которого включает эпитоп МАт 19С7. Рекомбинантные фрагменты элюировали раствором 0.1 М глицина рН 2.0.

Биотинилирование белков. В работе были использованы два типа биотинилирующих агентов. Реагенты первого типа (биотинизотиоцианат или ВТС, биотин-ПЭГ₂-N-гидроксисукцинимид и биотин-SS-сульфо-N-гидроксисукцинимид), осуществляют биотинилирование белков по аминокруппам. При этом может происходить частичная потеря иммунохимической активности белка из-за модификации функционально значимых остатков. Другие два реагента – биотин-ПЭГ₂-иодоацетил и биотин-ПЭГ₂-малеимид (МРВ) обеспечивают сайт-специфическое биотинилирование по аминокислотным остаткам цистеина.

Иммуоферментный анализ (ИФА). Метод ИФА использовали для анализа и сравнения иммунохимической активности МАт 19С7 и его фрагментов. В качестве антигена использовали hcTnI или тропониновый комплекс ИТС (комплекс, в состав которого входят молекулы тропонина I, Т и С), выделенный из сердца человека, в концентрации 1 мкг/мл на ФСБ. В лунки с засорбированным антигеном наносили растворы МАт 19С7 или его фрагментов разной концентрации. Для детекции комплекса антитела с антигеном использовали антитела, специфичные к Fab-фрагментам иммуноглобулинов, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma), в сочетании с субстратом ТМВ. Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм на приборе Victor 1420 Multilabel counter (Wallac, Финляндия).

Флуороиммунный анализ (ФИА) «сэндвич»-типа. В нашей работе мы использовали ФИА «сэндвич»-типа для изучения иммунохимических свойств как биотинилированного, так и небитинилированного МАт 19С7 и его фрагментов. Для этого одно из антител (МАт 19С7 или его фрагменты) сорбировали на поверхность планшета за счет неспецифического связывания либо, в случае использования биотинилированного антитела, за счет взаимодействия биотина с поверхностью планшета с иммобилизованным стрептавидином. Затем в лунки планшета добавляли антиген в разных концентрациях,

после чего связавшийся с иммобилизованным антителом антиген детектировали антителом 560 (кроме этого антитела, при анализе с иммобилизацией мутантных форм scFv-фрагментов также использовали такие детектирующие антитела, как MF4 и 625), содержащим стабильный хелат европия в качестве метки. Количество метки в каждой лунке определяли, измеряя интенсивность флуоресценции с использованием прибора Victor 1420 Multilabel counter (PerkinElmer, США).

Детекция поверхностного плазмонного резонанса (surface plasmon resonance, SPR). Изучение кинетики связывания МАт 19С7 и его фрагментов с антигеном проводили методом детекции SPR на приборе Biacore X. Для этого на поверхность чипа иммобилизовывали тропониновый комплекс ТС и затем проводили детекцию сигнала в форме кинетических кривых при нанесении растворов исследуемых антител в разных концентрациях. Расчет констант связывания проводили в программе BiaEvaluation 3.1.

Моделирование *in silico*. Для моделирования трехмерной структуры Fv-фрагментов мы использовали программы RosettaAntibody, PIGS (Prediction of Immunoglobulin Structure), MODELLER, SWISS-MODEL, I-TASSER и 3D-JIGSAW, а для проведения докинга – программу Autodock. Для генерации моделей мутантных форм с точечными мутациями и расчета энергии полученных моделей использовали программу FoldX. Результаты работы данных программ, представляющие собой файлы в различных форматах, конвертировались в другие форматы и сводились воедино с использованием программ, написанных на языке Python. Расчеты проводились на кластере MeatGrinder научно-учебного центра «Биоинформатика» Института проблем передачи информации РАН. Для визуализации трехмерных структур белковых молекул и различных манипуляций с ними использовалась программа Rymol.

Получение фаговых частиц. Для выделения библиотеки фаговых частиц клетки, трансформированные фагидами pSEX81/scFv-H3Lib, содержащими мутированные гены scFv-фрагментов, растили до оптической плотности при 600 нм 0.4-0.6. Затем проводили заражение бактерий фагом-хелпером M13K07 в течение 30 мин при 37°C. Инфицированные клетки переводили в свежую среду и растили при 37°C до оптической плотности 0.3-0.6, после чего температуру понижали до 30°C и инкубировали в течение 17-20 часов. Для очистки фаговых частиц использовали метод двойного переосаждения в PEG/NaCl (20% PEG-6000, 2.5M NaCl). Количество фаговых частиц оценивали, исходя из того, что раствору с оптической плотностью при 269 нм равной 0.3 соответствует концентрация около 2×10^{12} фаговых частиц на 1 мл. Основным способом подсчета фаговых частиц был метод титрования раствора, содержащего фаговые частицы с последующим заражением этими частицами суспензии бактериальных клеток и подсчетом

количества клеток, выросших на чашке с антибиотиком.

Различные способы отбора при фаговом дисплее.

Библиотеку фаговых частиц, несущих мутированные scFv-фрагменты МАт 19С7 на своей поверхности, подвергали отбору на способность к связыванию с hсTnI двумя способами – на поверхности планшета и в растворе. При первом типе отбора на поверхность лунок планшета сорбировали антиген, после чего в эти лунки наносили раствор фаговых частиц, затем проводили интенсивную отмывку тех фаговых частиц, которые были прочно связаны с поверхностью планшета, а фаговые частицы, оставшиеся иммобилизованными после отмывки, элюировали. При втором типе отбора взаимодействие биотинилированного антигена (тропониновый комплекс IC или пептид Tni88) с фаговыми частицами проходило в растворе. Смесь фаговых частиц с антигеном инкубировали при перемешивании, затем наносили в лунки планшета с предсорбированным стрептавидином. В результате фаговые частицы, связанные с биотинилированным антигеном, иммобилизовывались на поверхности планшета.

Отбор на поверхности планшета (panning)

На поверхность планшета сорбировали тропониновый комплекс IC в концентрации 5-100 нг в лунку (100 мкл), после чего проводили блокировку поверхности планшета и фаговых частиц. Заблокированные лунки инкубировали с раствором фаговых частиц в блокировочном растворе, после чего проводили интенсивную промывку лунок буфером ФСБ с добавлением Tween-20 (ФСБТ). Для вытеснения антигена из прочных комплексов с фаговыми частицами в некоторых экспериментах кроме вышеуказанной промывки также проводили «конкурентную промывку», то есть добавление в лунки промывочного буфера, содержащего либо МАт 19С7, либо различные концентрации Tni88 пептида (10-1000х молярный избыток), после чего лунки снова подвергали интенсивной промывке. В некоторых экспериментах для разрушения прочных комплексов между антигеном и фаговыми частицами после промывки дополнительно проводили «предэлюцию», т.е. инкубацию с раствором с субоптимальными значениями pH (3-5) с последующей интенсивной отмывкой лунок от диссоциировавших фаговых частиц. Элюцию иммобилизованных фаговых частиц проводили либо путем непосредственного добавления в каждую лунку 100 мкл клеток штамма TG1 в фазе логарифмического роста с последующей инкубацией в течение 30 мин при 37°C без перемешивания, либо путем добавления 100 мкл одного из элюирующих растворов: 1) 0.1 М глицинового буфера pH 2.2, инкубация с которым проводилась в течение 10 мин с перемешиванием и последующей нейтрализацией путем добавления 2 М Трис-буфера; 2) 10 мкг/мл раствора трипсина в ФСБТ, инкубация с которым проводилась в течение 30 мин с

перемешиванием; 3) 10 мМ раствора ДТТ в ФСБТ, инкубация с которым проводилась в течение 5 мин с перемешиванием. Полученный после безклеточной элюции раствор, содержащий фаговые частицы, смешивали с трехкратным избытком по объему клеток TG1 в фазе логарифмического роста и далее инкубировали в течение 30 мин при 37°C без перемешивания. Определение количества фаговых частиц в растворах элюатов проводили путем высевания зараженных клеток на чашки Петри. По 20 клонов с чашек Петри после завершения каждого типа отбора секвенировали для анализа мутаций.

Отбор в растворе

При отборе в растворе фаговые частицы инкубировали с биотинилированным пептидом TnI88 в концентрации 10 нМ, после чего в раствор добавляли 1000х избыток небитинилированного пептида Tni88 в качестве конкурирующего агента. Перед началом сорбции на поверхность планшета с предсорбированным стрептавидином фаговых частиц в смеси с антигеном, проводили блокировку как поверхности лунок планшета, так и фаговых частиц с антигеном. Лунки после инкубации промыли 3 раза блокировочным буфером, после чего стадии промывки, элюции и титрования фаговых частиц проводили так же, как при отборе на поверхности планшета.

Основные результаты и их обсуждение

Первым этапом данной работы было определение последовательности генов, кодирующих две полипептидные цепи, входящие в состав Fab-фрагмента – легкую цепь (ЛЦ) и фрагмент тяжелой цепи (фТЦ) МАт 19С7. Для этого из клеток гибридомы, продуцирующей МАт 19С7, была выделена тотальная РНК с помощью набора реагентов YellowSolve фирмы Clonogene (Россия), на основе которой методом обратной транскрипции была получена кДНК с использованием M-MLV обратной транскриптазы (Силекс М, Россия). Из полученной кДНК фрагменты, соответствующие ЛЦ и фТЦ, были амплифицированы методом ПЦР, а их последовательность была определена методом секвенирования. На основе полученных последовательностей создавали молекулярно-генетические конструкции (МГК) для экспрессии рекомбинантных Fab и scFv-фрагментов.

Для получения рекомбинантных Fab-фрагментов (rFab) было необходимо провести экспрессию двух цепей, из которых состоит Fab-фрагмент, – ЛЦ и фТЦ МАт 19С7. Для этого мы использовали два подхода: 1) независимая экспрессия ЛЦ и фТЦ в цитоплазме с последующей ренатурацией и восстановлением гетеродимерной структуры Fab-фрагментов, 2) экспрессия функционально-активных rFab-фрагментов в периплазматическом пространстве клетки *E.coli*. Для получения scFv-фрагментов был

синтезирован ген, содержащий переменные домены обеих цепей, соединенных линкером. После получения функционально-активные рекомбинантные фрагменты были очищены методом аффинной хроматографии, а их свойства были изучены при помощи различных иммунохимических и биохимических методов в сравнении с МАт 19С7 и его Fab-фрагментами, полученными в результате протеолиза под действием папаина (eFab).

Получение rFab-фрагментов МАт 19С7 из цитоплазмы клеток *E.coli*

Получение rFab-фрагментов методом ренатурации включало несколько стадий. Сначала были созданы МГК для экспрессии ЛЦ и фТЦ МАт 19С7. Для этого фрагменты, соответствующие ЛЦ и фТЦ, амплифицированные методом ПЦР из кДНК, были клонированы в вектор рЕТ23а+ по рестрикторным сайтам HindIII и XhoI с образованием МГК рЕТ23а+/LC и рЕТ23а+/HC, соответственно. При амплификации в конце последовательности гена ЛЦ перед стоп-кодоном был добавлен кодон цистеина. Полученные плазмиды трансформировали в клетки *E. coli* штамма DH5 α .

Для экспрессии рекомбинантных ЛЦ и фТЦ МАт 19С7 полученными МГК трансформировали клетки *E.coli* штамма BL21(DE3)pLysS, в которых осуществляли независимую экспрессию каждой из цепей, входящих в состав Fab-фрагментов. После проведения экспрессии клетки лизировали и фракционировали, а полученные фракции анализировали методом ДСН-электрофореза и иммуноблоттинга (см. рис. 1). Из рисунка видно, что во фракции ТВ присутствуют мажорные белки, имеющие молекулярную массу около 25 кДа, которые специфически взаимодействуют при использовании метода иммуноблоттинга с детектирующими поликлональными антителами, специфичными к Fab-фрагментам. Из этого следует, что при экспрессии в *E.coli* ЛЦ и фТЦ локализуются во фракции ТВ. При этом в растворимой фракции ЛЦ и фТЦ присутствуют лишь в следовых количествах. Поэтому на последующих этапах работы мы проводили выделение ЛЦ и фТЦ из препаратов ТВ и восстановление их функциональной структуры.

Получение функционально-активных rFab-фрагментов проводили путем осуществления полной денатурации ЛЦ и фТЦ с разрушением всех дисульфидных связей и последующего создания оптимальных окислительно-восстановительных условий для формирования правильных дисульфидных связей и восстановления гетеродимерной структуры rFab-фрагментов. Из полученного раствора функционально-активные rFab-фрагменты очищали методом аффинной хроматографии на хроматографическом носителе Sulfolink, конъюгированном с пептидом TnI88, последовательность которого включает эпитоп МАт 19С7 (см. рис. 2). Из графика видно, что элюция rFab-фрагментов с носителя

происходит в единственном пике, и элюирующийся белок имеет молекулярную массу около 50 кДа. Чистота полученного препарата гFab составляет 70-80% с наибольшим выходом около 2.5 мг на 1 литр культуральной среды, что соответствует 20% иммунохимически активного белка от общего количества белка (ЛЦ + фТЦ) из тельц включения.

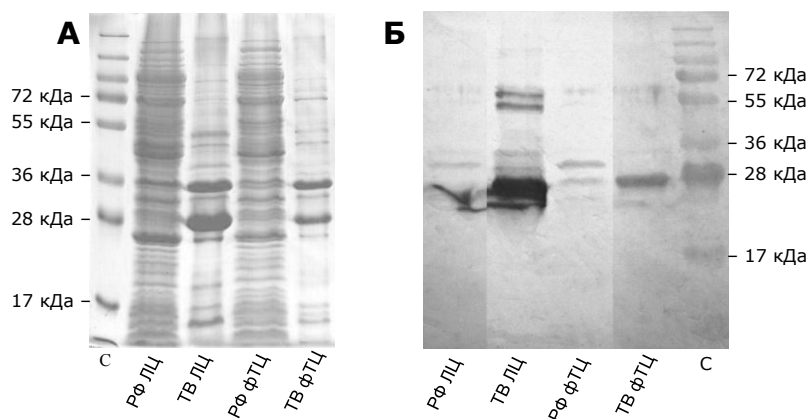


Рис. 1. Анализ внутриклеточной локализации ЛЦ и фрагмента ТЦ методом ДСН-электрофореза (А) в восстанавливающих условиях и иммуноблоттинга (Б). С – нанесены белковые стандарты фирмы Fermentas (Литва). РФ – растворимая фракция, ТВ – тельца включения.

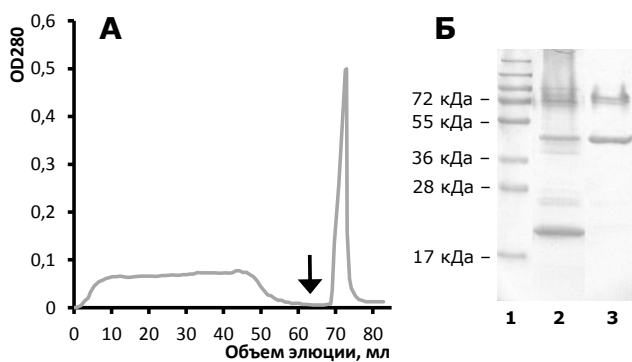


Рис. 2. Очистка рекомбинантных Fab-фрагментов МАТ 19С7 методом аффинной хроматографии. А) Профиль элюции при очистке гFab на аффинной колонке. Стрелкой обозначено начало элюции гFab раствором 0.1 М глицина с рН 2.0. Б) Анализ проб из наносимого на колонку раствора (дорожка 2) и из элюата (дорожка 3) на содержание гFab методом ДСН электрофореза в восстанавливающих условиях. На дорожку 1 нанесены белковые стандарты фирмы Fermentas (Литва).

Таким образом, мы получили препарат гFab-фрагментов методом ренатурации из ТВ. Однако существенным недостатком этого метода является сложность процедуры и длительное время, затрачиваемое на процесс ренатурации. В связи с этим, на следующем этапе нашей работы мы решили протестировать метод получения гFab-фрагментов, используя направленную экспрессию в периплазматическом пространстве *E.coli*.

Получение гFab-фрагментов МАТ 19С7 из периплазматического пространства клеток *E.coli*

Для того чтобы получить функционально-активные гFab-фрагменты, локализованные в периплазматическом пространстве клеток *E.coli*, необходимо осуществить коэкспрессию ЛЦ и фТЦ, каждая из которых содержит сигнальную последовательность для направления обеих цепей в периплазматическое пространство в одной и той же клетке. В периплазматическом пространстве выполняются такие условия правильного формирования структуры многих белков, как 1) присутствие специализированных шаперонных структур, 2) подходящие окислительно-

восстановительные условия для формирования дисульфидных связей. В связи с этим, данный метод позволяет получать нативные белки в растворимой форме, тогда как для получения нативных белков из фракции ТВ требуется дополнительный этап – ренатурация.

Для получения rFab в периплазматическом пространстве мы создали МГК рЕТ22b+/pelB-LC/pelB-НС, кодирующую обе цепи Fab-фрагмента на основе вектора рЕТ22b+, содержащую промотор и сигнальный пептид pelB перед каждым из генов (см. рис. 3). Для создания этой МГК была использована последовательность гена, кодирующего ЛЦ с дополнительным аминокислотным остатком цистеина, последовательность гена фТЦ из МГК рЕТ23a+/НС и участок последовательности вектора рЕТ22b+, в состав которого входят Т7 промотор и сигнальная последовательность pelB. Правильность полученной МГК была проверена методом секвенирования.

Поскольку экспрессия rFab-фрагментов в периплазматическом пространстве клетки *E. coli* характеризуется достаточно низким выходом синтезированного рекомбинантного белка, мы провели серию экспериментов для оптимизации условий экспрессии и количества синтезированных rFab-фрагментов, протестировав зависимость выхода экспрессии от используемых штаммов бактерий, времени экспрессии, состава среды и способа индукции. Мы пришли к выводу, что для

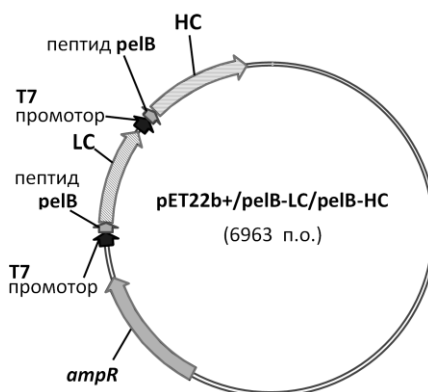


Рис. 3. Схема МГК рЕТ22b+/pelB-LC/pelB-НС для периплазматической экспрессии rFab-фрагментов.

периплазматической экспрессии rFab-фрагментов МАт 19С7 лучше всего подходят клетки *E. coli* штамма Rosetta. Наибольший выход rFab-фрагментов (2.5 мг на литр культуральной среды) был получен при использовании среды роста бактерий 3×LB и инкубации клеток при пониженной температуре 25°C в течение 20 часов без добавления IPTG. Согласно нашим данным, большая часть rFab-фрагментов попадает в культуральную среду и лишь их незначительное количество остается в периплазматическом пространстве. Чистота полученного препарата rFab-фрагментов после очистки на аффинном носителе Sulfolink-Tni88 составляет также 70-80%.

Получение рекомбинантных scFv-фрагментов методом ренатурации из телец включения *E. coli*

На основе последовательности, полученной в результате секвенирования генов ЛЦ и фТЦ мы создали три МГК для экспрессии рекомбинантных scFv-фрагментов: scFv1 и

scFv2, имеющие VL и VH домены, расположенные в разной последовательности, а также фрагмент scFv3, аналогичный scFv1, но содержащий в начале линкерного участка дополнительный остаток цистеина для осуществления направленного биотинилирования по SH-группе (см. рис. 4). Гены scFv1-3 были синтезированы и оптимизированы по составу кодонов для экспрессии в клетках *E. coli* в компании GenScript. Клонирование каждого из генов scFv в вектор pET22b+ проводили как по рестриктным сайтам NdeI и XhoI, так и NcoI и XhoI. Использование рестрикционного сайта NcoI во втором случае позволило поместить ген scFv после *pelB* последовательности, повышающей вероятность периплазматической локализации синтезированного белка. Таким образом, мы получили МГК для экспрессии scFv-фрагментов с локализацией как в цитоплазме, так и в периплазматическом пространстве.

Экспрессию фрагментов scFv1-3 проводили в клетках *E. coli* штамма Rosetta(DE3) аналогично экспрессии rFab-фрагментов. По нашим данным, вне зависимости от наличия *pelB* сигнального пептида, все типы рекомбинантных scFv-фрагментов накапливались в нерастворимой форме в виде ТВ. Поэтому в дальнейших экспериментах использовались плазмиды без *pelB* последовательности, а получение функционально-активных scFv-фрагментов проводили методом ренатурации белка из ТВ. Также как и при получении функционально-активных rFab-фрагментов из фракции ТВ, в случае scFv-фрагментов использовался метод ренатурации. Протокол для scFv-фрагментов был разработан на основе экспериментов с ренатурацией rFab. Для очистки функционально-активных scFv-фрагментов из раствора после ренатурации использовали метод аффинной хроматографии на носителе Sulfolink-Tni88. Выход иммунохимически активных scFv-фрагментов составил до 5 мг на литр культуральной среды, а доля иммунохимически активного белка от общего количества белка ТВ составила около 20-35%.



Рис. 4. Строение генов для экспрессии scFv фрагментов: фрагменты scFv1 и scFv2 отличаются порядком входящих в их состав доменов (VL, VH), а scFv3 аналогичен scFv1, однако в начале линкерной последовательности содержит дополнительный остаток цистеина.

Полученные препараты рекомбинантных фрагментов МАт 19С7 использовались для изучения их биохимических и иммунохимических свойств.

Исследование биохимических и иммунохимических свойств рекомбинантных фрагментов МАт 19С7

В нашей работе мы исследовали такие биохимические и иммунохимические

свойства полученных rFab и scFv-фрагментов МАт, как электрофоретическая подвижность, способность взаимодействовать с hcTnI и аффинность этого взаимодействия, а также их способность к сорбции на поверхности планшета.

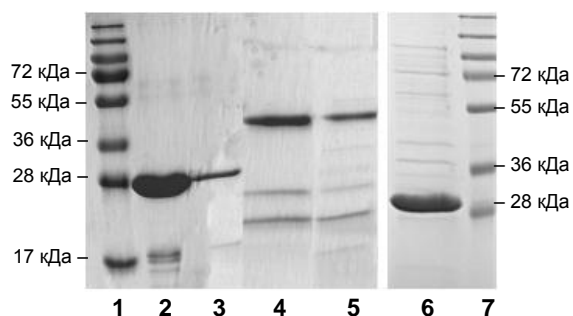


Рис. 5. Анализ проб рекомбинантных фрагментов методом ДСН электрофореза в невосстанавливающих (дорожки 4-5) и восстанавливающих условиях (дорожки 2-3,6). На дорожки 1 и 7 нанесены белковые стандарты фирмы Fermentas (Литва), на дорожки 2 и 4 нанесен очищенный препарат rFab, полученный методом ренатурации из телец включения, на дорожки 3 и 5 нанесен очищенный препарат rFab, полученный в результате периплазматической экспрессии, а на дорожку 6 – очищенный препарат scFv2, полученный методом ренатурации из телец включения.

Из анализа рекомбинантных фрагментов МАт 19С7 методом ДСН-электрофореза (см. рис. 5) видно, что в невосстанавливающих условия rFab-фрагменты имеют кажущуюся молекулярную массу около 50 кДа, которая вдвое уменьшается в восстанавливающих условиях, так как rFab-фрагмент распадается на составляющие его ЛЦ и фТЦ. scFv-фрагменты представляют собой полосу с кажущейся молекулярной массой 30 кДа.

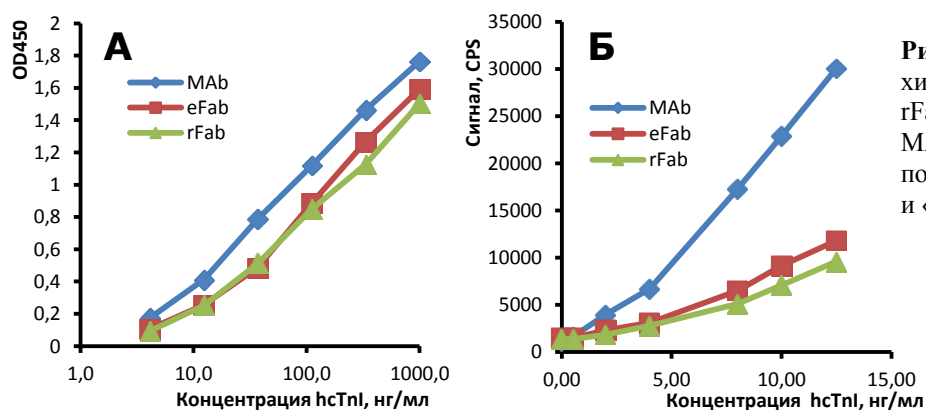


Рис. 6. Сравнение иммунохимических свойств eFab, rFab и полноразмерного МАт 19С7 («МАб») с помощью методов ИФА (А) и «сэндвич»-ФИА (Б).

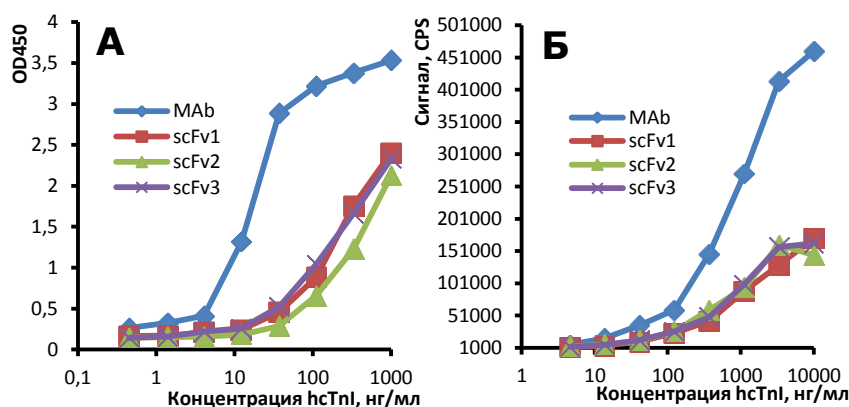


Рис. 7. Сравнение иммунохимических свойств scFv1-3 и полноразмерных молекул МАт 19С7 («МАб») с помощью методов «сэндвич»-ФИА (А) и ИФА (Б).

Сравнение иммунохимических свойств рекомбинантных фрагментов проводили такими методами, как ИФА, ФИА и SPR. Как видно из представленных результатов (см. рис. 6-7), иммунохимическая активность eFab и rFab-фрагментов практически не

отличается, а фрагменты scFv1-3 также демонстрируют сходные свойства. Небольшое снижение сигнала в случае rFab-фрагментов по сравнению с eFab-фрагментами можно объяснить наличием некоторого количества примесных белков в препарате rFab-фрагментов. Однако уровень сигнала в пробах с полноразмерным МАт 19С7 («МАб») существенно выше, чем в случае рекомбинантных фрагментов, из-за бивалентности полноразмерных антител, лучшего взаимодействия с детектирующими антителами (ИФА) и наличия большего количества сайтов, по которым может происходить конъюгирование с хелатом европия (ФИА). Результаты анализа иммунохимической активности МАт 19С7 и их фрагментов не отличаются при использовании в качестве антигена тропонинового комплекса (ТС) вместо hcTnI. Кинетические кривые eFab и rFab-фрагментов, полученные методом SPR, практически совпадают во всем диапазоне используемых концентраций; значения их кинетических констант также очень близки (см. табл. 1). Анализ разных типов scFv-фрагментов методом SPR показал небольшие различия в их кинетике связывания антигена с разбросом в значениях констант аффинности $2.5-6.5 \cdot 10^{-8}$ М; для фрагментов scFv2 характерна несколько более быстрая диссоциация.

	$k_a \cdot 10^4, \text{M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$	$k_d \cdot 10^{-3}, \text{c}^{-1}$	$K_D \cdot 10^{-8}, \text{M}$
eFab	3.57	1.42	3.98
rFab-ib	4.09	1.29	3.15
rFab-pp	2.36	1.17	4.94
scFv2	4.42	1.53	3.46

Таблица 1. Расчетные значения констант взаимодействия фрагментов МАт 19С7 с тропониновым комплексом ТС. k_a и k_d – константы скорости ассоциации и диссоциации, K_D – равновесная константа диссоциации; rFab-ib – rFab-фрагменты, полученные из ТВ, а rFab-pp – из периплазматического пространства.

Направленное биотинилирование рекомбинантных фрагментов антител и исследование сорбционных свойств биотинилированных антител

Биотинилирование антител – один из наиболее распространенных подходов, используемых для совершенствования иммунохимических систем за счет возможности увеличить плотность и прочность иммобилизации антител на поверхности планшетов, покрытых стрептавидином, а также оптимизировать ориентацию иммобилизованных антител. В нашей работе мы использовали два способа биотинилирования антител - направленное (или сайт-специфическое) и ненаправленное. Направленное биотинилирование проводили с использованием МРВ по специально включенному в последовательность рекомбинантных фрагментов свободному остатку цистеина, который расположен в удаленной от паратопа части молекулы и поэтому не оказывает влияние на взаимодействие антитела с антигеном. Можно ожидать, что увеличение числа молекул, способных взаимодействовать с антигеном, при ориентированной иммобилизации будет приводить к увеличению детектируемого сигнала и повышению чувствительности иммунохимической системы. Ненаправленное биотинилирование проводили по

аминогруппам с помощью ВІТС.

С использованием метода SPR было показано, что как направленное, так и ненаправленное биотинилирование не влияет на аффинность МАт 19С7. Это может быть связано с тем, что МАт 19С7 не имеет свободных боковых аминогрупп в области связывания антигена, а биотинилирование по имеющимся свободным аминогруппам не оказывает существенного влияния на антиген-связывающий участок.

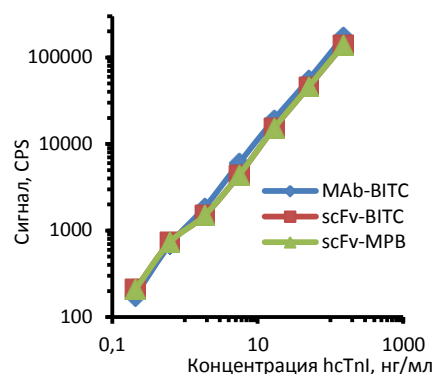


Рис. 8. Калибровочные графики зависимости сигнала от концентрации hcTnI.

С использованием биотинилированных рекомбинантных фрагментов МАт 19С7 удалось построить калибровочные графики, имеющие как значения сигнала, так и угол наклона очень близкие к полученным с полноразмерными МАт 19С7 («MAb», см. рис. 8). При определении концентрации hcTnI методом ФИА в сыворотках больных с диагностированным острым инфарктом миокарда значения, полученные при измерении с использованием биотинилированных МАт 19С7 и их scFv-фрагментов, обладают высокой сходимостью (коэффициент корреляции >0.99 ; $p < 0.001$). Таким образом, ФИА системы, созданные с использованием рекомбинантных scFv-фрагментов, могут быть использованы для измерения концентрации hcTnI в образцах сывороток.

Из полученных данных можно заключить, что rFab и scFv-фрагменты МАт 19С7 обладают необходимыми иммунохимическими свойствами для использования в диагностических системах и являются адекватной заменой антителам, полученным гибридным методом. Поэтому данные фрагменты могут быть использованы в качестве основы для увеличения аффинности МАт 19С7 путем изменения их последовательности.

Модификация последовательности scFv-фрагментов МАт 19С7

Поскольку использование рекомбинантных антител открывает возможности для усовершенствования их свойств, в данной работе была исследована возможность увеличения аффинности рекомбинантных фрагментов антител с помощью мутагенеза. Для поиска остатков, которые могли бы привести к увеличению аффинности антител, было использовано два подхода: моделирование *in silico* с последующей *in vitro* проверкой найденных мутантных форм и создание библиотеки мутантных форм с последующим отбором наилучших мутантных вариантов методом фагового дисплея.

Моделирование мутантных scFv-фрагментов МАт 19С7 – *in silico* отбор.

Первым методом поиска мутаций для увеличения аффинности, которым мы воспользовались, был метод *in silico* отбора в виду его быстроты, дешевизны и возможности анализа всех точечных мутаций и пар точечных мутаций, входящих в состав CDR-участков. Первым этапом *in silico* отбора было моделирование Fv-фрагмента – участка, принимающего участие в связывании антигена. Для моделирования структуры Fv-фрагментов МАт 19С7 был использован метод гомологичного моделирования, реализованный в программах RosettaAntibody, PIGS, MODELLER, SWISS-MODEL, I-TASSER и 3D-JIGSAW (одна из полученных моделей Fv-фрагмента, а также модель scFv-фрагмента МАт 19С7, приведены на рис. 9). Все полученные модели использовались в качестве стартового материала для моделирования структуры комплекса с антигеном методом докинга с использованием программы Autodock. В качестве модели антигена для докинга использовались участки структуры эпитопа из структур центральной части тропонинового комплекса 1J1E и 1J1D (Protein Data Bank). Модели комплекса Fv-фрагмента с эпитопом, обладающие наименьшей расчетной энергией, использовали для проведения виртуального мутагенеза остатков, входящих в состав CDR-участков, с использованием программы FoldX.

В результате анализа энергий взаимодействия мутантных форм с антигеном, рассчитанных с использованием программы FoldX, 2 варианта мутантных форм с единичными точечными мутациями и 8 с двумя точечными мутациями отобрали для экспрессии и анализа *in vitro*. В дополнение к поиску мутантных вариантов МАт 19С7 с увеличенной аффинностью путем моделирования был проведен экспериментальный скрининг библиотеки мутантных форм.

Получение библиотеки мутантных форм scFv-фрагментов МАт 19С7 для фагового дисплея. В качестве альтернативы для *in silico* поиска мутантных форм с увеличенной аффинностью использовали фаговый дисплей – метод одновременного отбора scFv-фрагментов с высокой аффинностью, находящихся на поверхности фаговых частиц, из множества мутантных форм. Для этого была создана библиотека генов scFv-фрагментов, мутированных в районе аминокислотных остатков CDR-H3 петли (12 остатков) и провели ее клонирование по рестрикционным сайтам NcoI и NotI в вектор pSEX81 для фагового дисплея. При этом в каждой мутируемой аминокислотной позиции исходный аминокислотный остаток заменяли на все типы аминокислотных остатков, кроме цистеина. Синтез библиотеки мутантных вариантов генов scFv2 был выполнен в сотрудничестве с компанией MetGen. На основе библиотеки генов была получена библиотека фаговых частиц, несущих на своей поверхности мутированные scFv-фрагменты, которые подвергали отбору на основе их антиген-связывающих свойств.

Подбор условий и отбор мутантных форм scFv-фрагментов МАт 19С7 методом фагового дисплея. В связи с тем, что во взаимодействии разных фрагментов антител с антигеном могут преобладать различные типы связей, наиболее перспективным подходом представляется использование различных вариантов отбора (отбор на поверхности планшета и отбор в растворе, различные условия сорбции, блокировки, промывок и элюции). Способы отбора, которые были использованы в данной работе, можно поделить на две группы: отбор на поверхности планшета (panning) и отбор в растворе. Для увеличения селективности каждого типа отбора применяли такие методы, как добавление конкурирующего агента, использование промывочных буферов с разной ионной силой и разным содержанием детергента, «предэлюция» буферами с рН 3 и рН 5 фаговых частиц, непрочно связанных с антигеном, а также «специфическая элюция», то есть элюция только тех фаговых частиц, которые связаны с поверхностью планшета только за счет взаимодействия с иммобилизованным антигеном scFv-фрагмента на поверхности этих фаговых частиц.

Для того чтобы проверить данные моделирования о типах мутаций, приводящих к увеличению аффинности scFv-фрагментов, а также для сравнения аффинности вариантов мутантных антител, найденных в результате фагового дисплея, проводилось клонирование их генов в экспрессионные вектора рЕТ23а+ или рЕТ28а+ и затем их экспрессия в клетках Rosetta(DE3) (аналогично клонированию scFv1-3 фрагментов и их экспрессии в нерастворимом виде). Полученные в результате ренатурации и очищенные на хроматографическом носителе Sulfolink-Tni88 рекомбинантные scFv-фрагменты анализировали методами ИФА и SPR в сравнении с scFv-фрагментами дикого типа.

Результаты сравнения аффинности мутантных форм, предсказанных *in silico*.

На основе *in silico* мутагенеза была предсказана увеличенная аффинность для двух мутантных форм с одиночными мутациями таких как, mut1 (NL32D) и mut2 (WH100_AT), и для восьми с двойными мутациями – mut3(KL49D, DH104F), mut4(WL94D, NL32E) mut5(QL90D, WL94D), mut6(NL92D, YL96E), mut7(KL49D, DH104N), mut8(DH104Q, NL32E), mut9(YL50R, NL32Y), mut10(YH27D, YH54F). Однако лишь для двух мутантных форм с одиночными мутациями и для шести с двойными (кроме mut5 и mut7) удалось детектировать экспрессию. Из них, согласно результатам ИФА, лишь две мутантные формы с одиночными мутациями и две с двойными (mut9, mut10) обладали детектируемой иммунохимической активностью. Причем угол наклона линейного участка кривых scFv-фрагментов дикого типа был больше, чем для кривых мутантных форма scFv (см. рис. 10). Это, а также более низкий уровень сигнала в зоне насыщения сигнала

(кривые scFv и mut1 на рис. 10А), указывает на более низкую аффинность мутантных вариантов scFv по сравнению с диким типом, что подтверждается с помощью метода SPR (см. рис. 11). При сравнении кинетических кривых мутантных форм с одиночными мутациями с кинетическими кривыми scFv-фрагментов дикого типа видно, что уровень сигнала, при котором кривая ассоциации достигает насыщения, значительно выше для кривой ассоциации scFv-фрагментов дикого типа. При сравнении кинетических кривых мутантных вариантов с двумя точечными мутациями с кинетическими кривыми scFv-фрагментов дикого типа видно, что при сходном значении сигнала в области насыщения кривой ассоциации, диссоциация мутантных форм происходит быстрее, чем диссоциация scFv-фрагмента дикого типа. В результате, мутантные scFv-фрагменты, для которых была предсказана *in silico* повышенная аффинность по сравнению с scFv-фрагментами дикого типа, на самом деле обладали меньшей аффинностью. Негативный результат моделирования мутагенеза *in silico* связан низкой точностью исходной модели Fv-фрагмента МАт 19С7 и ее комплекса с моделью эпитопа. Разрешение кристаллической структуры комплекса Fv-фрагмента МАт 19С7 с антигеном могло бы сделать моделирование мутагенеза намного более точным.

Результаты сравнения аффинности мутантных форм, отобранных методом фагового дисплея.

Для выявления вариантов scFv-фрагментов с увеличенной аффинностью методом фагового дисплея, 15-20 клонов после отбора каждого типа анализировались методом секвенирования для установления характерных типов аминокислотных замен среди отобранных мутантных форм. Наиболее часто встречающиеся из них были клонированы в экспрессионную плазмиду рЕТ28а+, экспрессированы в клетках Rosetta(DE3) и использованы для сравнения иммунохимических свойств с scFv-фрагментами дикого типа.

Всего было отсеквенировано 104 последовательности. В 6 последовательностях мутантных форм, найденных при отборе в растворе, были обнаружены делеции большей части последовательности гена scFv, поэтому последовательности, найденные в ходе этого отбора, были исключены из дальнейшего анализа. Из оставшихся 84 последовательностей 59 содержали одну или больше мутаций, остальные имели последовательность дикого типа. Некоторые из этих мутаций встречались более чем один раз (YH97Q – 12 раз; YH97F, AH100N – по три раза; AH100E, DH98Q, DH98H, WH100_AF, AH101K, AH101E, YH102D, YH102V, YH102F – по два раза). Также можно выделить аминокислотные позиции, которые часто мутированы в отобранных вариантах (H97 – 17,

H102 – 10, H100 – 9, H101 – 8, H98 – 6 раз). Поскольку повышенная встречаемость может свидетельствовать в том числе и о увеличенной аффинности этих клонов, были выбраны следующие мутантные формы для экспериментального сравнения иммунохимических свойств: phs1 (YH97F), phs2 (YH97Q), phs3 (AH100N), phs4 (AH100N, YH97F), phs5 (AH100N, YH97Q, YH102V), phs6 (AH100N, YH97Q, YH102D), phs7 (AH100N, YH97Q), phs8 (AH100N, YH102D).

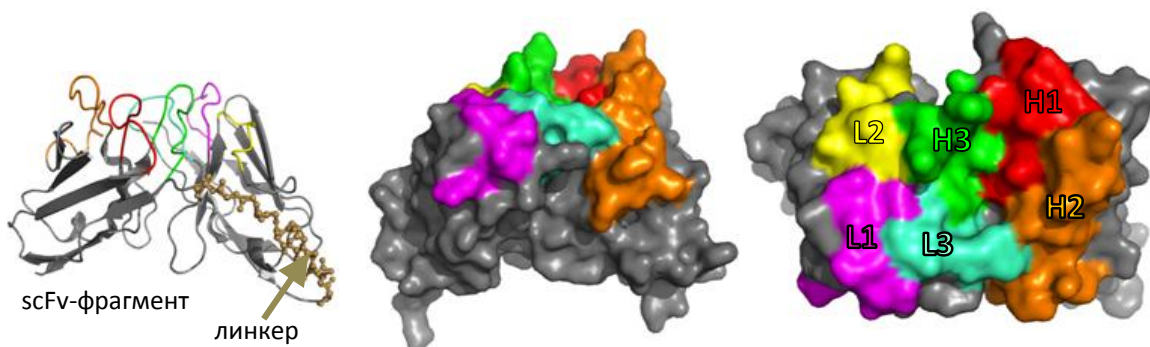


Рис. 9. Модель поверхности Fv-фрагмента МАт 19С7, построенная с использованием программы PIGS в разных проекциях. Серым цветом обозначены каркасные участки переменных доменов, а другими цветами – CDR-петли. Также на рисунке приведена модель scFv-фрагмента, сделанная с использованием программы I-TASSER, на которой обозначено положение линкерного пептида в структуре scFv-фрагмента.

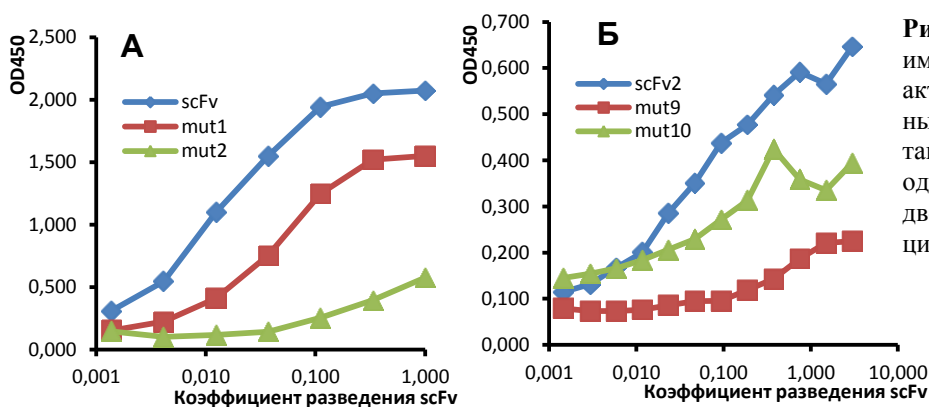


Рис. 10. Сравнение иммунохимической активности очищенных образцов мутантных форм с одиночными (А) и двойными (Б) мутациями методом ИФА.

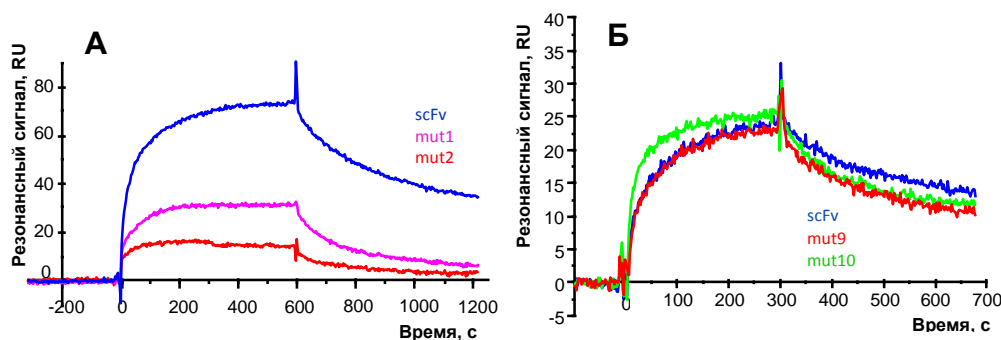


Рис. 11. Сравнение кинетики связывания с антигеном мутантных вариантов scFv с диким типом методом SPR. А – мутантные формы с одиночными точечными мутациями, Б – с двойными.

Выбранные для анализа scFv-фрагменты, содержащие одиночные, двойные и тройные мутации, были клонированы в экспрессионную плазмиду pET28a+ и экспрессированы в клетках штамма Rosetta(DE3). Препараты ренатурированных и очищенных мутантных scFv-фрагментов анализировали методами ИФА, SPR и ФИА в сравнении с scFv-фрагментами дикого типа.

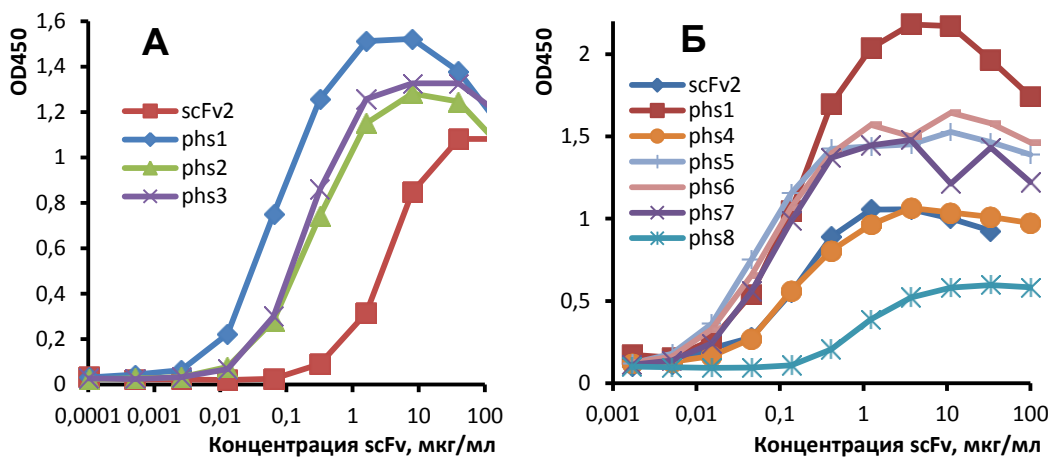


Рис. 12. Сравнение иммунохимической активности мутантных форм scFv-фрагментов (А – pbs1-3, Б – pbs1 и pbs4-8) с диким типом (scFv2) методом ИФА.

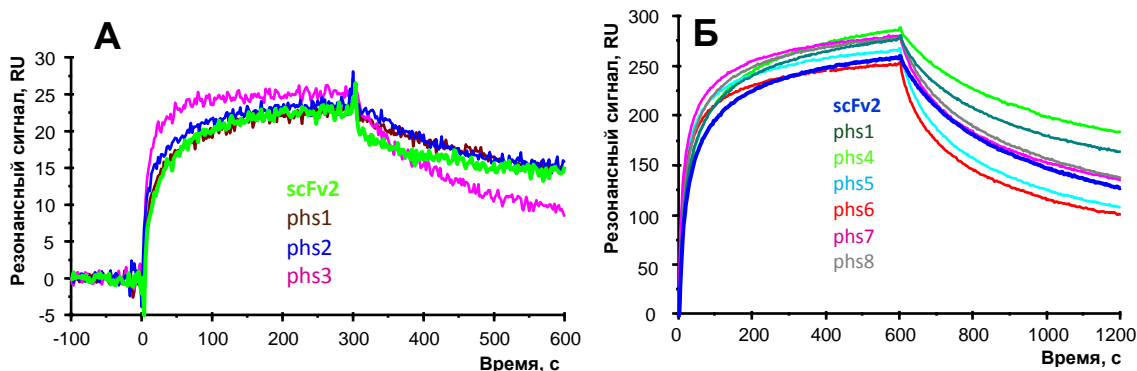


Рис. 13. Сравнение кинетики связывания с антигеном мутантных форм scFv-фрагментов (А – pbs1-3, Б – pbs1 и pbs4-8) с диким типом (scFv2) методом SPR.

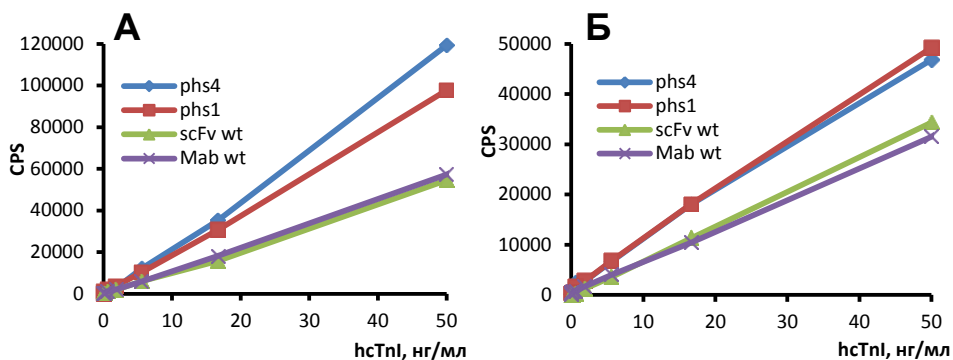


Рис. 14. Калибровочные графики ФИА, полученные при сорбции MAb 19C7 и его мутированных scFv-фрагментов, а также фрагментов дикого типа в сочетании с использованием разных детектирующих антител: MF4 (А) и 625 (Б).

Согласно данным ИФА, наибольший уровень сигнала в области насыщения наблюдается для мутантных вариантов pbs1-3 и pbs5-7 (см. рис. 12А и Б, соответственно), и этот уровень превышает соответствующее значение для scFv-фрагментов дикого типа. Также видно, что угол наклона линейного участка этих кривых несколько больше для вышеуказанных мутантных форм, чем для scFv-фрагментов дикого типа. Большое количество молекул этих мутантных форм, оставшихся связанными с антигеном на поверхности планшета после сорбции на единицу концентрации, может свидетельствовать об увеличенной аффинности данных scFv-фрагментов по сравнению с диким типом. Также следует отметить, что для мутантных форм pbs1-3 при более низких концентрациях

(0.001-0.1 мкг/мл) достигаются более высокие значения сигнала, чем фоновые. Однако результаты метода SPR (см. рис. 13) не для всех мутантных вариантов согласуются с результатами ИФА. Вариант p_hs1 обладает повышенной аффинностью по отношению к дикому типу согласно экспериментам, полученным обоими методами (k_d в 1.2 раза меньше, чем у scFv-фрагментов дикого типа). В то же время вариант p_hs3, согласно результатам SPR, обладает более низкой аффинностью, несмотря на возможно несколько увеличенную скорость ассоциации, тогда как по результатам ИФА этот вариант демонстрирует увеличенный сигнал. Мутантный вариант p_hs4, содержащий комбинацию мутаций, входящих в состав p_hs1 и p_hs3, согласно методу SPR обладает наибольшей аффинностью среди исследованных фрагментов (k_d в 1.7 раз меньше, чем у scFv-фрагментов дикого типа). Однако этот результат не согласуется с данными ИФА, по которым этот вариант не отличается по иммунохимическим свойствам от scFv-фрагмента дикого типа. Кинетические кривые вариантов p_hs7-8 практически не отличаются от дикого типа, а для вариантов p_hs5-6 при обеих концентрациях видно, что их аффинность ниже, чем у scFv-фрагментов дикого типа. Результаты использованных методов для сравнения иммунохимических свойств вариантов антител могут различаться, поскольку в этих методах используются разные способы иммобилизации антигена, а взаимодействие между антителом и антигеном происходит в разных буферных растворах, что оказывает влияние на параметры связывания. Поэтому, кроме оценки аффинности методами ИФА и SPR, мы провели сравнение калибровочных графиков для определения концентрации hсTnI методом ФИА «сэндвич»-типа с использованием биотинилированного МАт 19С7 и его мутированных scFv-фрагментов p_hs1 и p_hs4, а также scFv-фрагментов дикого типа. Как видно из полученных кривых (см. рис. 14), величина сигнала, полученного с использованием мутированных вариантов scFv-фрагментов МАт 19С7 в качестве иммобилизованных антител и любого из детектирующих антител 625 и MF4, превосходит величину сигнала для scFv-фрагментов дикого типа. Более высокий уровень сигнала указывает увеличенную чувствительность детектирующих систем, полученных на основе мутантных форм p_hs1 и p_hs4, связанную с повышенной аффинностью использованных мутантных форм.

Таким образом, для мутантных форм p_hs1 и p_hs4 на основании данных нескольких видов анализа можно сделать вывод об увеличенной аффинности по сравнению с scFv-фрагментами МАт 19С7 дикого типа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе были получены рекомбинантные scFv и Fab-фрагменты МАт 19С7 и было показано, что они распознают как очищенный hcTnI, так и hcTnI в крови человека.

Наличие scFv-фрагментов МАт 19С7, обладающих аналогичными антиген-связывающими свойствами по сравнению с исходными антителами, позволило нам провести эксперименты по увеличению аффинности антител методом мутагенеза. Для этого были использованы две стратегии мутагенеза – поиск мутаций методом *in silico* мутагенеза и генерацию библиотеки из множества мутантных форм в области CDR-H3 с последующим отбором наиболее аффинных вариантов методом фагового дисплея.

Предсказанные методом *in silico* мутагенеза модификации последовательности, соответствующие мутантным вариантам антител с увеличенной аффинностью, были исследованы экспериментально. Восемь из десяти мутантных форм scFv-фрагментов МАт 19С7 были получены в бактериальных клетках в количествах, обеспечивающих их выделение и очистку. Четыре мутантные формы обладали способностью к связыванию с антигеном, но ни одна из этих мутантных форм не имела аффинность выше, чем у дикого типа. Методом фагового дисплея удалось обнаружить ряд мутаций, которые часто встречаются среди отобранных клонов. Все восемь исследованных мутантных форм обладали способностью к связыванию антигена, причем, согласно результатам анализа иммунохимических свойств (ИФА, SPR, ФИА), аффинность всех полученных вариантов была не хуже чем у дикого типа по данным как минимум одного из использованных методов. Для мутантных форм pbs1 и pbs4 данные нескольких методов сравнения иммунохимической активности позволяют сделать вывод об увеличенной аффинности по сравнению с scFv-фрагментами дикого типа.

Таким образом, в ходе работы были получены рекомбинантные scFv и Fab-фрагменты МАт 19С7, обладающие сходными иммунохимическими свойствами с исходным полноразмерным МАт 19С7 и детектирующие близкие значения концентрации hcTnI в сыворотках больных. Эти фрагменты были использованы в качестве основы для увеличения их аффинности методом мутагенеза, и мы можем заключить, что нам удалось получить как минимум два мутантных варианта scFv-фрагмента, которые обладают более высокой аффинностью, чем scFv-фрагменты дикого типа.

Выводы

1. Определена нуклеотидная последовательность МАт 19С7, кодирующая ЛЦ и фТЦ. Были созданы молекулярно-генетические конструкции для экспрессии рекомбинантных scFv и Fab-фрагментов антитела, подобраны условия для экспрессии и очистки рекомбинантных фрагментов.
2. Показано, что рекомбинантные фрагменты МАт 19С7 и исходное антитело обладают аналогичными иммунохимическими свойствами и параметрами связывания как с очищенным hcTnI, так и с hcTnI в крови человека.
3. Проведено *in silico* моделирование всех видов мутантных scFv-фрагментов МАт 19С7 с одиночными и избранными двойными мутациями в антиген-связывающих участках, и на основе моделей рассчитана энергия связывания этих мутантных форм с антигеном.
4. Из десяти мутантных форм scFv-фрагментов МАт 19С7, для которых была предсказана *in silico* увеличенная аффинность, удалось экспрессировать четыре иммунохимически активные формы. Ни одна из этих мутантных форм не имела аффинность выше, чем у дикого типа.
5. Создана библиотека фаговых частиц, несущих на своей поверхности scFv-фрагменты, содержащие мутации в области CDR-Н3, и проведен отбор фаговых частиц на основе их способности к связыванию антигена. Найдены аминокислотные позиции в CDR-Н3 МАт 19С7 (Н97, Н102, Н100, Н101, Н98) и конкретные мутации (ҮН97F, ҮН97Q, АН100N, ҮН102V, ҮН102D), которые наиболее представлены среди отобранных вариантов.
6. Была осуществлена экспрессия восьми мутантных вариантов scFv-фрагментов МАт 19С7, отобранных методом фагового дисплея. Два из них (ҮН97F и АН100N+ҮН97F) обладали увеличенной аффинностью по сравнению с scFv-фрагментами дикого типа.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Альтшулер ЕП**, Серебряная ДВ, Катруха АГ. Получение рекомбинантных антител и способы увеличения их аффинности. Успехи биологической химии, 2010; 50:203-258.
2. **Альтшулер ЕП**, Вылегжанина АВ, Катруха ИА, Березникова АВ, Серебряная ДВ. Использование рекомбинантных фрагментов моноклонального антитела для количественного определения тропонина. Биохимия, 2012; 77 (12):1653-1660.
3. **Altshuler E**. Comparison of biochemical and immunochemical properties of the recombinant scFv and Fab fragments of antibodies TnIMAB specific to human cardiac troponin I. Abstract, FEBS and IUBMB congress, Seville, Spain, 4-9 September 2012, The FEBS journal, 2012, Vol. 279, Supplement 1, p. 335.
4. **Альтшулер ЕП**, Серебряная ДВ, Постников АБ, Катруха АГ. Сравнение биохимических и иммунохимических свойств рекомбинантных scFv и Fab фрагментов антител TnIMAT, специфичных к тропонину I сердца человека. Тезисы конференции "Фармацевтические и медицинские биотехнологии", секция "Биотехнология генно-инженерных продуцентов", 2012, стр. 108-109, Москва.
5. **Альтшулер ЕП**. Получение и характеристика рекомбинантных Fab фрагментов антител клона 19C7, специфичных к сердечной изоформе тропонина I человека. Тезисы конференции «Ломоносов-2009», секция «Биохимия», 2009, стр. 37-38, Москва.