

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМБИНАЦИИ РИБОСОМНОГО И ФАГОВОГО ДИСПЛЕЕВ ДЛЯ БЫСТРОГО ОТБОРА ВЫСОКОАФФИННЫХ VHH-ФРАГМЕНТОВ АНТИТЕЛ АЛЬПАК

Ю. Е. Кравченко, С. В. Иванов, Д. С. Кравченко, Е. И. Фролова, С. П. Чумаков ✉

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

Селекция антител с помощью фагового дисплея предполагает предварительное клонирование репертуара последовательностей, кодирующих антигенсвязывающие участки, в фагмиду, что считается «бутылочным горлышком» метода, ограничивающим итоговое разнообразие библиотек и ведущим к потере слабо представленных вариантов еще до начала процедуры селекции. Отбор в бесклеточных условиях при помощи рибосомного дисплея лишен этого недостатка, однако отличается высокой чувствительностью к артефактам ПЦР и присутствию РНКаз. Целью работы было исследование эффективности сочетания двух методов: проведения предварительной селекции в бесклеточной системе для обогащения исходной библиотеки с последующим клонированием и заключительной селекцией при помощи фагового дисплея. Предполагалось, что такой режим селекции позволит устранить недостатки каждого из методов и повысить эффективность отбора. Для селекции использовали последовательности VHH-антител альпаки, удобные для построения иммунной библиотеки из-за отсутствия VL-доменов. Анализ иммунных библиотек из генов семейств VH3, VHH3 и VH4 показал, что в группах генов VH3 и VH4 доля VHH-антител незначительна, и селекция из комбинированной библиотеки менее эффективна, чем из библиотеки последовательностей семейства VHH3. Мы установили, что комбинация рибосомного и фагового дисплея приводит к более высокому обогащению высокоаффинными фрагментами и позволяет избежать потери исходного разнообразия при клонировании. Комбинированный метод позволил получить большее количество различных высокоаффинных последовательностей, а все протестированные VHH-фрагменты оказались способными специфично распознавать мишень, в том числе в тотальных белковых экстрактах клеточных культур.

Ключевые слова: наноклетка, VHH-антитела, рибосомный дисплей, фаговый дисплей, биопаннинг, PDLIM4

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, уникальный код проекта RFMEFI60716X0156.

Информация о вкладе авторов: Ю. Е. Кравченко выделяла генетический материал альпак, готовила РНК, проводила ИФА; С. В. Иванов конструировал библиотеки VHH-фрагментов антител, проводил селекцию методом фагового дисплея; Д. С. Кравченко нарабатывал белковые препараты, работал с эукариотическими клеточными культурами; Е. И. Фролова планировала исследование, проводила иммунизацию животных, редактировала рукопись; С. П. Чумаков планировал исследование, проводил селекцию методом рибосомного дисплея, анализировал результаты, писал рукопись.

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

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

Статья получена: 08.12.2018 **Статья принята к печати:** 22.12.2018 **Опубликована онлайн:** 24.02.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.002

COMBINATION OF RIBOSOME AND PHAGE DISPLAY FOR FAST SELECTION OF HIGH AFFINITY VHH ANTIBODY FRAGMENTS

Kravchenko YE, Ivanov SV, Kravchenko DS, Frolova EI, Chumakov SP ✉

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

Selection of antibodies using phage display involves the preliminary cloning of the repertoire of sequences encoding antigen-binding domains into phagemid, which is considered the bottleneck of the method, limiting the resulting diversity of libraries and leading to the loss of poorly represented variants before the start of the selection procedure. Selection in cell-free conditions using a ribosomal display is devoid from this drawback, however is highly sensitive to PCR artifacts and the RNase contamination. The aim of the study was to test the efficiency of a combination of both methods, including pre-selection in a cell-free system to enrich the source library, followed by cloning and final selection using phage display. This approach may eliminate the shortcomings of each method and increase the efficiency of selection. For selection, alpaca VHH antibody sequences suitable for building an immune library were used due to the lack of VL domains. Analysis of immune libraries from the genes of the VH3, VHH3 and VH4 families showed that the VHH antibodies share in the VH3 and VH4 gene groups is insignificant, and selection from the combined library is less effective than from the VHH3 family of sequences. We found that the combination of ribosomal and phage displays leads to a higher enrichment of high-affinity fragments and avoids the loss of the original diversity during cloning. The combined method allowed us to obtain a greater number of different high-affinity sequences, and all the tested VHH fragments were able to specifically recognize the target, including the total protein extracts of cell cultures.

Keywords: nanobodies, VHH antibodies, ribosome display, phage display, biopanning, PDLIM4

Funding: the work was funded by MESR, project code RFMEFI60716X0156.

Author contribution: Kravchenko YuE — Alpaca blood collection and processing, RNA extraction, ELISA; Ivanov SV — construction of libraries of VHH-fragments of antibodies, selection by phage display; Kravchenko DS — protein purification, experiments with eucaryotic cell cultures; Frolova EI — research planning, animal immunization, manuscript editing; Chumakov SP — research planning, selection by ribosome display, analysis of the results, writing a manuscript.

Compliance with ethical standards: the work with animals was carried out in accordance with the principles and requirements of the International Animal Care Laboratory and the Council of Europe Directive (86/609 / EEC) of November 24, 1986.

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

Received: 08.12.2018 **Accepted:** 22.12.2018 **Published online:** 24.02.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.002

Моноклональные антитела, а также их антигенсвязывающие фрагменты — один из важнейших инструментов для проведения биологических исследований, медицинской диагностики и терапии заболеваний. Традиционный способ получения антител путем отбора индивидуальных клонов гибридом отличается трудоемкостью и низкой производительностью. Более эффективные подходы, включающие селекцию *in vitro* из библиотек участков антител, ответственных за взаимодействие с антигеном, упрощают получение антител против заданной мишени и позволяют отбирать варианты антител, обладающие определенными свойствами, например способностью блокировать взаимодействие двух белковых молекул. Среди способов селекции *in vitro* наибольшее распространение получила технология фагового дисплея, позволяющая относительно быстро и с высокой надежностью создавать библиотеки антигенсвязывающих фрагментов антител. Технология основана на получении генетически модифицированных фаговых частиц, экспонирующих на своей поверхности антигенсвязывающие участки антител. Селекция включает инкубирование смеси фаговых частиц с иммобилизованным антигеном. После отмыва и элюирования связавшиеся варианты фаговых частиц разноожируют в перmissive бактериях с последующим отбором индивидуальных вариантов, обладающих наибольшей представленностью в смеси [1]. Одним из недостатков метода является необходимость клонирования репертуара фрагментов, кодирующих антигенсвязывающие участки, в специальную фагмиду и последующего получения пула трансформированных клеток для наработки библиотек фаговых частиц. Этот этап считается «бутылочным горлышком» метода, ограничивающим разнообразие получаемых клонотек. Редкие варианты фрагментов антител могут в результате теряться еще до начала стадии селекции [2]. Другой недостаток обусловлен самой структурой традиционных антител, в которых связывание антигена осуществляется взаимодействием участков, расположенных на разных полипептидных цепях. При создании клонотек вероятность попадания компонентов каждого антигенсвязывающего участка тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина в состав одного одноцепочечного антигенсвязывающего фрагмента scFv крайне мала из-за случайности процесса образования комбинаций. В результате, в получаемой смеси в основном присутствуют неактивные сочетания участков тяжелых и легких цепей, что существенно затрудняет отбор вариантов с требуемыми свойствами.

Для преодоления недостатка, связанного с необходимостью проведения трансформации бактерий, разработаны варианты, основанные на селекции в бесклеточных условиях, в частности, рибосомный дисплей. Такой метод основан на совмещенной бесклеточной системе транскрипции и трансляции, где комплексы, состоящие из транскриптов (мРНК), рибосомы и растущих цепей белка, соответствующих репертуару антигенсвязывающих участков антител, подвергаются аффинной селекции на иммобилизованном антигене. Связавшиеся варианты амплифицируются при помощи ОТ-ПЦР, в результате чего достигается обогащение искомыми вариантами [3]. Хотя исходное разнообразие репертуара при использовании этого метода выше, в ходе селекции довольно велики шансы отбора вариантов антигенсвязывающих участков, обладающих низкой специфичностью узнавания мишени, но имеющих преимущества амплифирования при ПЦР [4]. Можно

предположить, что при сочетании методов рибосомного и фагового дисплея удастся добиться преодоления слабых сторон каждого из подходов и повышения совокупной эффективности отбора. При этом можно предварительно проводить селекцию вариантов в бесклеточной системе, достигая обогащения высокоаффинными вариантами, а затем клонировать получаемый репертуар фрагментов в фагмиду и проводить окончательную селекцию при помощи фагового дисплея.

Животные семейства верблюдовых обладают, помимо антител традиционной структуры, антителами, состоящими только из тяжелых цепей иммуноглобулинов (*variable heavy-heavy*, VHH-антителами) [5]. Этот тип антител образовался в результате мутации в шарнирной области тяжелой цепи, что привело к делеции участка связывания тяжелой и легкой цепей. Для компенсации отсутствия антигенраспознающего участка второй цепи VH-домены таких антител имеют более протяженные участки CDR3, что обеспечивает высокую аффинность и специфичность распознавания антигенов. Антитела такой структуры позволяют получать компактные антигенраспознающие участки. В процессе селекции репертуаров антител *in vitro*, при отсутствии необходимости комбинирования из двух полипептидных цепей, итоговые пулы оказываются лишенными неактивных вариантов. VHH-антитела уже широко используются для проведения *in vitro* селекции методом фагового дисплея, а на их основе создаются продукты для диагностики и терапии заболеваний [6].

Целью работы было получить из иммунной библиотеки альпаки при помощи различных методов VHH-антитела к опухолевому маркеру PDLIM4 и проверить, позволяет ли сочетание рибосомного и фагового дисплея повысить эффективность отбора последовательностей антигенсвязывающих фрагментов, обладающих высокой аффинностью и специфичностью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Иммунизация животного

Источником биологического материала (крови) служило животное альпака (*Vicugna pacos*) семейства верблюдовых. В качестве антигена использовали очищенный белок PDLIM4 в количестве 700 мкг, растворенный в полном (для первичной иммунизации) или неполном (для повторных иммунизаций) адьюванте Фрейнда (*Pierce*; CSHA) согласно протоколу производителя. Иммунизацию альпаки проводили в три этапа (первичная и две повторных, с интервалом в 3 недели) посредством введения препарата внутримышечно в бедро животного. Спустя 4 недели после последней иммунизации производили забор венозной крови в количестве 100 мл. Фракцию мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) получали из свежезабранной гепаринизированной крови альпаки с помощью центрифугирования с раствором фиколла плотностью 1,077 (ПанЭко; Россия) согласно стандартному протоколу.

Выделение РНК, синтез кДНК и ПЦР

Образец тотальной РНК получали из клеток PBMC с помощью реагента ExtractRNA (Евроген; Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Целевые молекулы мРНК, кодирующие VHH-фрагменты, использовали для приготовления кДНК с праймером

CH2-IgG-sp rev (таблица) с использованием набора реагентов ProtoScript (NEB; США). Дальнейшую амплификацию проводили с использованием высокоточной полимеразы Tersus (Евроген; Россия) и праймеров AlpVHH3 uni fwd, AlpVH4 uni fwd, AlpVH3 uni fwd, AlpVHH-R1 и AlpVHH-R2 для создания библиотеки, содержащей гены семейств VH3, VHH3 и VH4, либо с помощью праймеров AlpVHH3 uni fwd, AlpVHH-R1 и AlpVHH-R2 для создания библиотеки, содержащей только гены семейства VHH3 (таблица).

Получение экспрессионных конструкций для селекции методом рибосомного дисплея

Конструкции для рибосомного дисплея получали в реакции бридж-ПЦР в смеси с предварительно амплифицированным с праймерами Flag-Ck (CGGATCCGGATTACAAGGACGACGACGATAAGACTGTGGCTGCACC) и Ck/for 4 (AACACTCTCCCCTGTTGAAGCT) фрагментом гена Ck с использованием концевых праймеров RD1x (GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAACAGACCACCATGTCTAG) и Ck/for 4. Полноразмерные конструкции выделяли из агарозного геля при помощи набора реагентов Cleanup standard (Евроген; Россия) и использовали для проведения селекции методом рибосомного дисплея.

Получение фагмидной библиотеки для селекции методом фагового дисплея

Фагмидную библиотеку получали при помощи клонирования амплифицированных последовательностей VHH в модифицированную фагмиду pHEN2-XB, содержащую рестриктные сайты XbaI и BamHI между последовательностями сигнала периплазматической локализации PelB и эпитопа с-Мус по указанным рестриктным сайтам, с использованием эндонуклеаз XbaI и BamHI-HF (NEB; США) и T4 DNA Ligase (NEB; США). Трансформации подвергали клетки штамма TG-1 при помощи электропоратора Genepulser (Bio-Rad; США).

Селекция методом рибосомного дисплея

Селекцию проводили согласно описанной ранее методике [7]. В общих словах, использовали набор для *in vitro* транскрипции-трансляции TNT T7 Quick for PCR (Promega; США), на реакцию брали по 20 мкл смеси и 100 нг экспрессионных конструкторов. Мишень (фрагмент PDLIM4, аминокислоты 111–224, соответствующие линкерной области между доменами LIM и PDZ) была иммобилизована за С-концевой биотин на гидрофильных стрептавидиновых магнитных микросферах, конъюгированных со стрептавидином (NEB; США) в количестве 100 нг на 5 мкл микросфер, в качестве мишени для контрселекции

выступали микросферы, обработанные биотином. Восстановление полноразмерных экспрессионных конструкций после селекции проводили с использованием набора реагентов OneTaq Onestep RT-PCR kit (NEB; США) и полимеразы HSTaq (Евроген; Россия) с использованием праймеров RD1x, RT1 (ACTTCGCAGGCGTAGAC) и Kc/for 9 (AACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTGTGACGGGCGAGCTCAGGCCCTGATGGGTGACTTCGCAGGCGTAGACTT TG). Клонирование прошедших селекцию конструкций осуществляли непосредственно после стадии ОТ-ПЦР по рестриктным сайтам XbaI и BamHI.

Селекция методом фагового дисплея

Селекцию проводили согласно опубликованному протоколу [8] с использованием антигена, иммобилизованного в соответствии с данным выше описанием и без проведения предварительной контрселекции.

Наработка растворимых форм VHH-фрагментов антител

Индивидуальные клоны клеток штамма TG-1, выявленные после селекции, использовали для получения препаратов бактериофага, которыми затем трансдуцировали клетки линии HB-2151, культивированные в среде M9. Трансдуцированные культуры выращивали на твердой среде в присутствии ампициллина, после чего индивидуальные колонии использовали для получения растворимого белка в жидкой среде в соответствии с описанным ранее протоколом [9]. Очистку проводили с использованием Ni-NTA magbeads (Cube Biotech; Германия) согласно рекомендациям производителя.

Оценка обогащения библиотек в ходе рибосомного и фагового дисплея

Для фагового дисплея оценку производили в соответствии с опубликованным ранее протоколом [8]. Лунки иммунологического планшета с сорбированным PDLIM4 (111–224 а. о.) либо бычьим сывороточным альбумином (контроль) обрабатывали препаратами экспонирующих VHH-фрагменты фаговых частиц, полученными после каждого раунда селекции. Детекцию производили с использованием меченых пероксидазой хрена антител к фагу M13 (Sino Biological; Китай; кат. 11973-MM05T-H). Для селекции методом рибосомного дисплея вместо фаговых частиц брали смеси комплексов мРНК-рибосома-белок, полученные при помощи набора для *in vitro* транскрипции-трансляции TNT T7 Quick for PCR (Promega; США). Детекцию осуществляли с использованием антител к эпитопу Flag, меченых пероксидазой хрена (Proteintech; США; кат. HRP-66008).

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных для амплификации VHH-фрагментов

AlpVHH3 uni fwd	GAACAGACCACCATGTCTAGASAGKTGCAGSTSGTRGAGTCTGKGGGAGG
AlpVH4 uni fwd	GAACAGACCACCATGTCTAGASAGGTGCAGSKGCAGGAGTCGGGCCAGGC
AlpVH3 uni fwd	GAACAGACCACCATGTCTAGASARKTGCRRTSGTRGAGWCYKGGGRRG
AlpVHH-R2	CCTTGAATCCGGATCCGGTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG
AlpVHH-R1	CCTTGAATCCGGATCCGGGGGTCTTCGCTGTGGTGCG
CH2-IgG-sp rev	GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC

Оценка связывающей способности индивидуальных вариантов VHH-фрагментов антител

Поверхность лунок иммунологического планшета покрывали PDLIM4 либо тотальными белковыми экстрактами, полученными из клеточных линий MBA-MB-231 и T47D в соответствии со стандартными протоколами, в количестве 10 мкг клеточного экстракта на лунку. Далее лунки обрабатывали очищенными препаратами VHH-фрагментов, полученными согласно вышеописанной процедуре; детекцию проводили с использованием биотинилированных антител к эпитопу Мус (СайСторЛаб; Россия; кат. PSM003BN-100) и стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена (R&D Systems; США; кат. DY998). Для получения статистически достоверных результатов каждую реакцию воспроизводили в трех независимых повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Многие работы, посвященные отбору VHH-фрагментов к различным мишеням, основаны на использовании разработанного более 15 лет назад набора праймеров для амплификации последовательностей VHH [10]. С тех пор локус VHH3 генома альпаки и ламы был проанализирован с помощью глубокого секвенирования и определены последовательности всех входящих в него генов [11]. Кроме того, получена информация, что некоторые гены локусов VH4 и VH3 также могут быть использованы для формирования зрелых VHH-антител. Мы собрали все известные последовательности генов VH3, VHH3 и VH4 и составили на их основе набор праймеров для амплификации всех членов каждого из семейств генов (таблица). В качестве обратных праймеров мы использовали хорошо зарекомендовавшие себя последовательности, соответствующие уникальным шарнирным областям VHH-антител. Каждый вариант праймеров был проверен тестовой реакцией ПЦР на

кДНК альпаки), полученной с использованием праймера на область CH2 тяжелой цепи иммуноглобулина, которая является общей для VHH-антител и антител традиционной структуры. Секвенирование индивидуальных клонов показало, что каждый из вариантов праймеров специфично амплифицирует варианты последовательностей, относящиеся к соответствующему семейству.

Каждая дополнительная стадия амплификации библиотеки VHH-фрагментов приводит к изменению представленности вариантов и вымыванию из нее редких последовательностей. Чтобы избежать снижения качества библиотек при комбинировании рибосомного и фагового дисплея мы модифицировали фагмиду pHEN2 и ввели в праймеры для создания конструкторов рибосомного дисплея рестриктивные сайты, что позволило напрямую клонировать библиотеку VHH-фрагментов в фагмиду (рис. 1).

Для того чтобы проверить, может ли комбинирование двух методов селекции приводить к увеличению ее эффективности, из общей исходной кДНК альпаки было сконструировано две библиотеки VHH-фрагментов: библиотека 1 состояла исключительно из последовательностей, относящихся к семейству VHH3, библиотека 2 состояла из последовательностей, входящих в семейства VH3, VHH3 и VH4. Каждая библиотека была клонирована в фагмиду, а также использована для получения линейного конструктора для селекции в бесклеточной системе. Фаговые библиотеки были подвергнуты трем раундам селекции, а библиотеки линейных конструкторов после первого раунда селекции методом рибосомного дисплея были разделены на две части: одну подвергли еще двум раундам селекции, а вторую клонировали в фагмиду и селектировали методом фагового дисплея. После каждого раунда у каждой из библиотек была оценена степень обогащения аффинными фрагментами при помощи прямого иммуноферментного анализа (ИФА) против отрицательного контроля — бычьего сывороточного альбумина, и мишени — линкерной области белка PDLIM4. Соотношения сигналов,

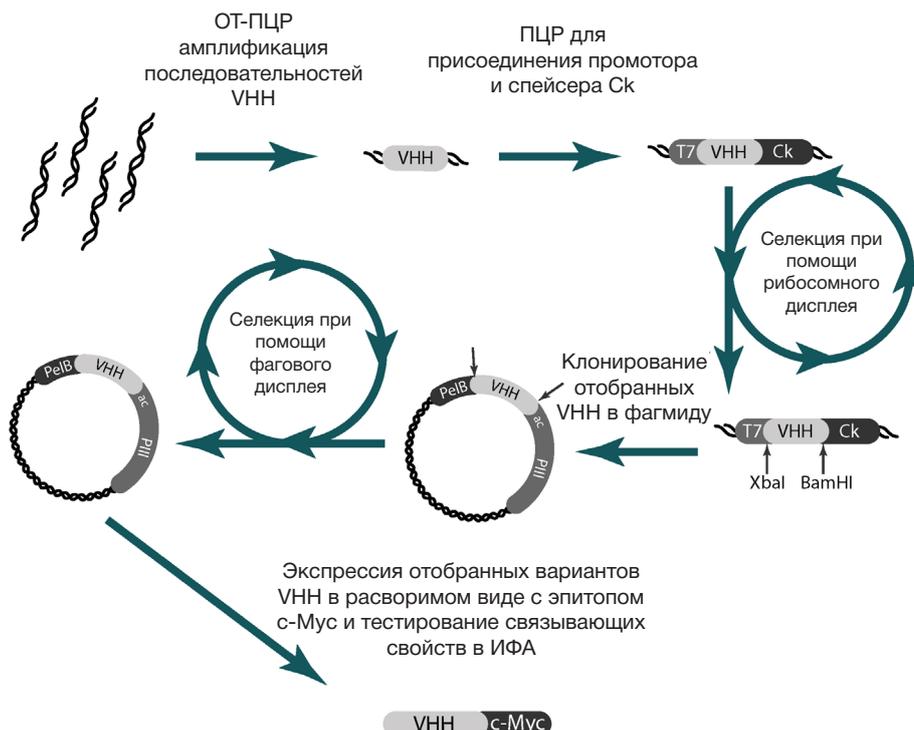


Рис. 1. Схема проведения селекции с последовательным использованием методов рибосомного и фагового дисплея

полученных в реакциях опыт/контроль, использовали для оценки представленности в библиотеке целевых VHH-последовательностей (рис. 2).

Результаты сравнения показали, что библиотека, состоящая исключительно из последовательностей семейства VHH3, демонстрировала большие темпы обогащения аффинными вариантами во всех трех режимах селекции. На основании этого можно сделать вывод, что семейства VHH3 и VHH4 не вносят существенный вклад в формирование разнообразия одноцепочечных VHH-антител, и их включение в итоговую библиотеку нецелесообразно. Если сравнивать эффективность селекции различными методами из библиотеки последовательностей семейства VHH3, то селекция в рибосомном дисплее оказалась гораздо менее эффективной, чем в фаговом. В среднем, обогащение от раунда к раунду составляло 26,45% для рибосомного и 220,4% для фагового дисплея. При этом использование сочетания методов селекции позволило повысить среднее обогащение до 355%.

После трех раундов селекции методом фагового дисплея и комбинированным методом из итоговых обогащенных библиотек было выделено и проанализировано по 35 индивидуальных клонов. Вопреки ожиданиям, разнообразие вариантов в итоговой библиотеке после комбинированной селекции было выше, чем после селекции методом фагового дисплея — было обнаружено 18 различных типов последовательностей, в то время как при фаговой селекции всего 11.

Для оценки того, насколько отобранные последовательности VHH-фрагментов способны специфично и аффинно взаимодействовать с мишенью, пять наиболее представленных вариантов полученных после

комбинированной селекции были экспрессированы в виде мономеров в штамме HB-2151, очищены при помощи аффинной хроматографии и протестированы методом ИФА. В качестве мишени были использованы препарат антигена PDLIM4 (центральная часть белка, уникальная для этого члена семейства PDLIM) либо суммарные белковые фракции клеточных линий MDA-MB-231 и T47D, характеризующихся нормальным и нокаутным статусом гена PDLIM4 [12] соответственно (рис. 3).

Результаты эксперимента показали, что все пять вариантов VHH-фрагментов способны специфично связывать белок PDLIM4. Вариант VHH-R53 обладал максимальной специфичностью в опыте с очищенным белком PDLIM4, но при этом достаточно интенсивно окрашивал PDLIM4-негативный образец белковой фракции из клеток T47D. Вариант VHH-R08 обладал несколько худшей специфичностью относительно очищенного белкового препарата, но демонстрировал наибольшую разницу сигналов в опытах с суммарными белковыми фракциями.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Независимо от использованного способа селекции, нами наблюдались различия в динамике обогащения функционально-активными фрагментами. Можно предположить, что доля VHH-антител для семейств генов VHH3 и VHH4 незначительна и что комбинированная библиотека может содержать большое количество неполноценных вариантов VHH-фрагментов, которые могли бы специфично связывать антиген только в паре с VL-фрагментом, и затрудняющих селекцию. Возможно, некоторые задачи могут потребовать использования такой

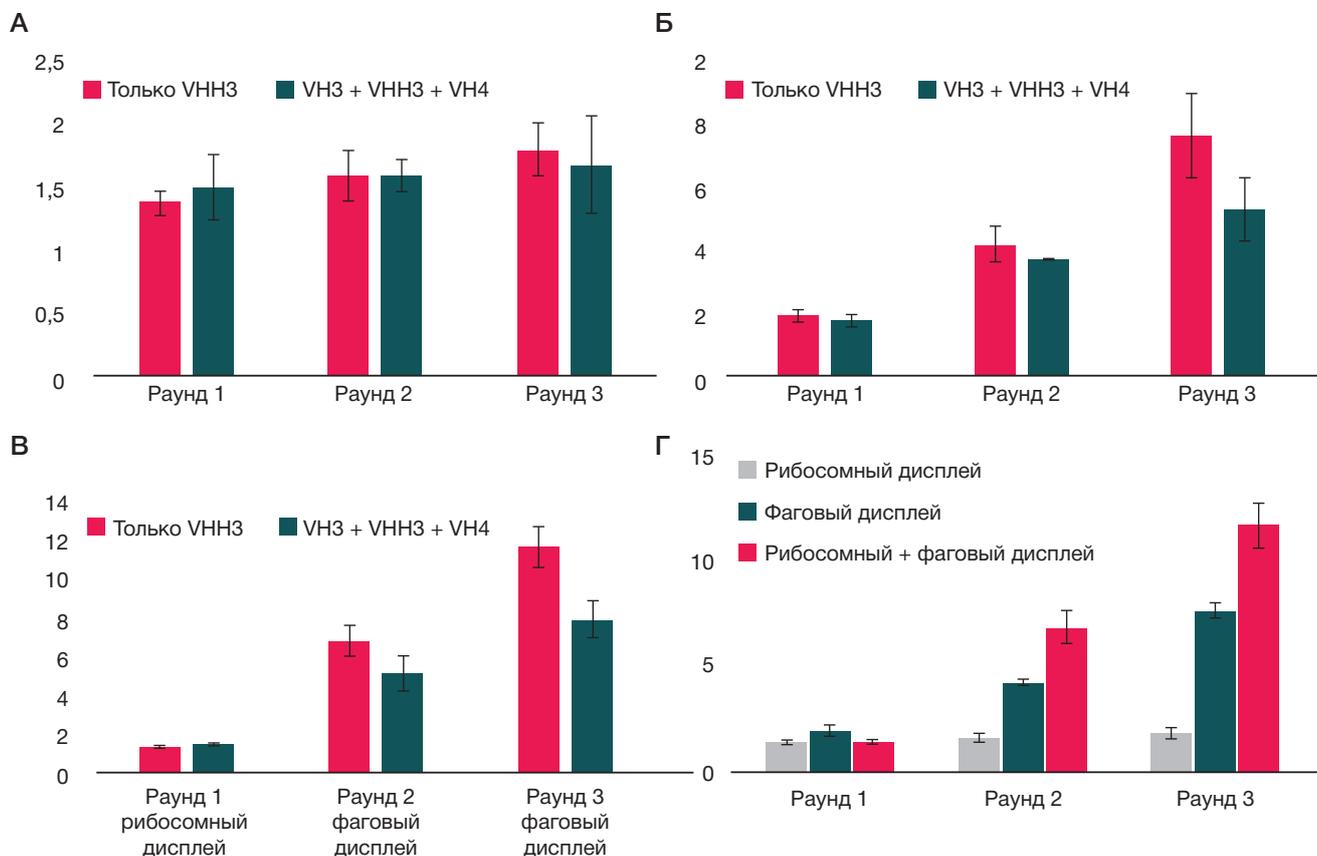


Рис. 2. Обогащение библиотек VHH-фрагментов в ходе селекции методом рибосомного дисплея (А); методом фагового дисплея (Б); при комбинировании рибосомного и фагового дисплея (В). Сравнение обогащения всеми тремя методами для библиотеки VHH3 (Г)

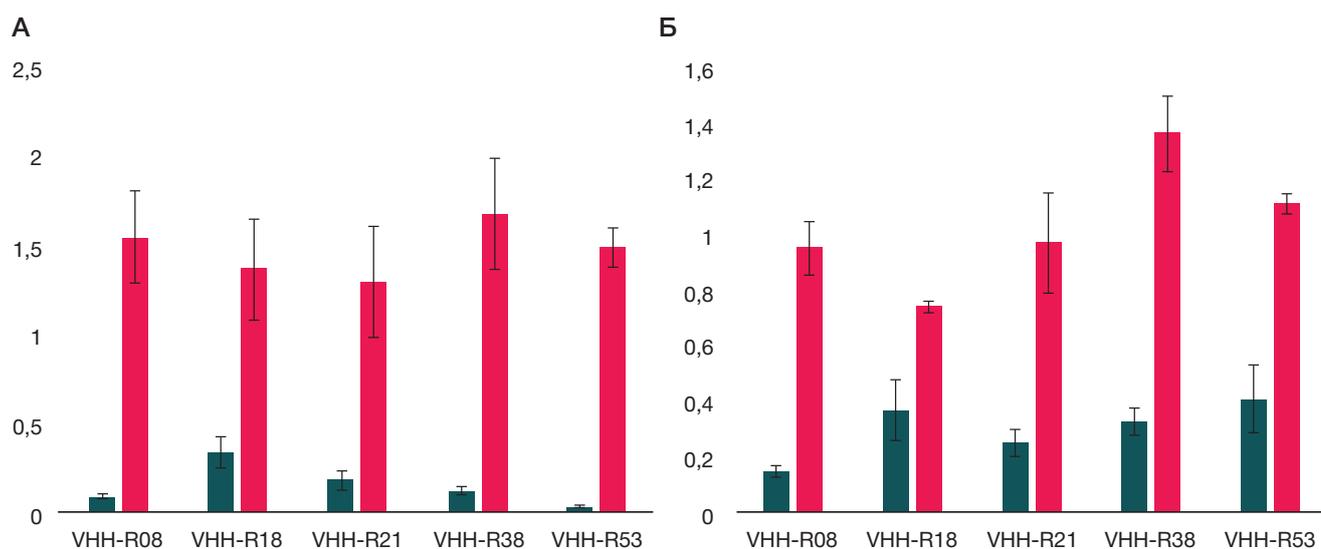


Рис. 3. Сравнение способности пяти отобранных вариантов VHH-фрагментов специфически окрашивать PDLIM4 в реакции ИФА

комбинации вариантов. Например, поскольку каркасная структура антител VHH-семейства альпак чрезвычайно близка по структуре антителам человека, такие антитела хорошо подходят для дальнейшей гуманизации [13]. Однако для рутинной селекции предпочтительно использование библиотеки, содержащей только члены семейства VHH3.

Относительно низкая эффективность селекции при использовании рибосомного дисплея может быть обусловлена двумя факторами: использованием слишком мягких условий, препятствующих удалению низкоаффинных последовательностей, либо систематической кросс-контаминацией библиотек ДНК-фрагментами, не полностью удаленными на стадии приготовления функциональных единиц библиотеки. При этом следует иметь в виду, что использование более жестких условий селекции и удаления ДНК может приводить к разрушению целевых комплексов мРНК-рибосома-белок. Представляется, что дальнейшая оптимизация условий данного метода селекции может повысить эффективность отбора, однако вряд ли качественно улучшит результат. Любопытно, что хотя при комбинированном методе селекции эффективность первого раунда, использовавшего рибосомный дисплей, была относительно низка (37% обогащения против 97% в первом раунде фагового дисплея), итоговая эффективность комбинированной селекции оказалась улучшенной. Вероятно, такая комбинация позволила повысить представленность перспективных вариантов VHH-фрагментов на стадии клонирования библиотеки в фагмиду, тогда как «паразитные» последовательности, сохранявшиеся от раунда к раунду при селекции в рибосомном дисплее, подвергались удалению в ходе последующего раунда фагового дисплея. В результате комбинированный метод селекции приводил к устранению характерного для метода фагового дисплея «бутылочного горлышка». В пользу этого также говорит большее

разнообразие вариантов VHH-фрагментов, обнаруженное в результате комбинированной селекции.

Отобранные нами варианты VHH-фрагментов демонстрировали высокую специфичность в отношении белка PDLIM4 в опытах *in vitro*. Однако в экспериментах с тотальными белковыми фракциями клеток некоторые варианты, по-видимому, были способны связываться и с другими белками семейства PDLIM. С точки зрения использования для определения статуса внутриклеточного PDLIM4, наибольший интерес представляет отобранный вариант VHH-R08, для которого неспецифическое связывание оказалось минимальным.

Можно заключить, что разработанные условия комбинирования методов селекции позволяют добиться лучших результатов без повышения трудозатрат и времени отбора, а также необходимости внесения дополнительных стадий амплификации при получении клонотек.

Выводы

Успешно протестирована новая система праймеров для амплификации всех членов семейства VHH3 и создания библиотек фрагментов VHH-антител для проведения комбинированной селекции методом рибосомного и фагового дисплея. Сравнение эффективности селекции показало, что комбинированный метод позволяет добиться большего обогащения библиотеки высокоаффинными фрагментами и уменьшить потерю исходного разнообразия репертуара при клонировании в фагмидный вектор. Селекцией комбинированным методом удалось получить большее количество вариантов высокоаффинных последовательностей, причем все VHH-фрагменты, подвергнутые индивидуальному тестированию, оказались способными специфически распознавать мишень (фрагмент белка PDLIM4) в реакциях как с очищенным препаратом белка, так и с суммарными белковыми фракциями клеток.

Литература

1. Carmen S, Jermutus L. Concepts in antibody phage display. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2002; 1 (2): 189–203. PubMed PMID: 15239904.
2. Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, Osbourn JK, Pope AR, Earnshaw JC, et al. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display

- library. *Nat Biotechnol.* 1996; 14 (3): 309–14. DOI: 10.1038/nbt0396-309. PubMed PMID: 9630891.
3. He M, Khan F. Ribosome display: next-generation display technologies for production of antibodies in vitro. *Expert Rev Proteomics.* 2005; 2 (3): 421–30. Epub 2005/07/08. DOI: 10.1586/14789450.2.3.421. PubMed PMID: 16000087.
 4. Ponsel D, Neugebauer J, Ladetzki-Baehs K, Tissot K. High affinity, developability and functional size: the holy grail of combinatorial antibody library generation. *Molecules.* 2011; 16 (5): 3675–700. Epub 2011/05/05. DOI: 10.3390/molecules16053675 [pii]. PubMed PMID: 21540796.
 5. Maass DR, Sepulveda J, Pernthaler A, Shoemaker CB. Alpaca (*Lama pacos*) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *J Immunol Methods.* 2007; 324 (1–2): 13–25. Epub 2007/06/15. DOI: S0022-1759(07)00119-6 [pii]. 10.1016/j.jim.2007.04.008. PubMed PMID: 17568607.
 6. Van Bockstaele F, Holz JB, Revets H. The development of nanobodies for therapeutic applications. *Curr Opin Investig Drugs.* 2009; 10 (11): 1212–24. Epub 2009/10/31. PubMed PMID: 19876789.
 7. He M, Taussig MJ. Eukaryotic ribosome display with in situ DNA recovery. *Nat Methods.* 2007; 4 (3): 281–8. DOI: 10.1038/nmeth1001. PubMed PMID: 17327849.
 8. Benhar I, Reiter Y. Phage display of single-chain antibody constructs. *Curr Protoc Immunol.* 2002; Chapter 10: Unit 10 9B. DOI: 10.1002/0471142735.im1019bs48. PubMed PMID: 18432867.
 9. Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif.* 2005; 41 (1): 207–34. PubMed PMID: 15915565.
 10. Harmsen MM, Ruuls RC, Nijman IJ, Niewold TA, Frenken LG, de Geus B. Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features. *Mol Immunol.* 2000; 37 (10): 579–90. PubMed PMID: 11163394.
 11. Avila F, Baily MP, Perelman P, Das PJ, Pontius J, Chowdhary R, et al. A comprehensive whole-genome integrated cytogenetic map for the alpaca (*Lama pacos*). *Cytogenet Genome Res.* 2014; 144 (3): 196–207. DOI: 10.1159/000370329. PubMed PMID: 25662411.
 12. Grigoriadis A, Mackay A, Noel E, Wu PJ, Natrajan R, Frankum J, et al. Molecular characterisation of cell line models for triple-negative breast cancers. *BMC Genomics.* 2012; (13): 619. DOI: 10.1186/1471-2164-13-619. PubMed PMID: 23151021.
 13. Deschacht N, De Groeve K, Vincke C, Raes G, De Baetselier P, Muyldermans S. A novel promiscuous class of camelid single-domain antibody contributes to the antigen-binding repertoire. *J Immunol.* 2010; 184 (10): 5696–704. DOI: 10.4049/jimmunol.0903722. PubMed PMID: 20404276.

References

1. Carmen S, Jermutus L. Concepts in antibody phage display. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2002; 1 (2): 189–203. PubMed PMID: 15239904.
2. Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, Osbourn JK, Pope AR, Earnshaw JC, et al. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat Biotechnol.* 1996; 14 (3): 309–14. DOI: 10.1038/nbt0396-309. PubMed PMID: 9630891.
3. He M, Khan F. Ribosome display: next-generation display technologies for production of antibodies in vitro. *Expert Rev Proteomics.* 2005; 2 (3): 421–30. Epub 2005/07/08. DOI: 10.1586/14789450.2.3.421. PubMed PMID: 16000087.
4. Ponsel D, Neugebauer J, Ladetzki-Baehs K, Tissot K. High affinity, developability and functional size: the holy grail of combinatorial antibody library generation. *Molecules.* 2011; 16 (5): 3675–700. Epub 2011/05/05. DOI: 10.3390/molecules16053675 [pii]. PubMed PMID: 21540796.
5. Maass DR, Sepulveda J, Pernthaler A, Shoemaker CB. Alpaca (*Lama pacos*) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *J Immunol Methods.* 2007; 324 (1–2): 13–25. Epub 2007/06/15. DOI: S0022-1759(07)00119-6 [pii]. 10.1016/j.jim.2007.04.008. PubMed PMID: 17568607.
6. Van Bockstaele F, Holz JB, Revets H. The development of nanobodies for therapeutic applications. *Curr Opin Investig Drugs.* 2009; 10 (11): 1212–24. Epub 2009/10/31. PubMed PMID: 19876789.
7. He M, Taussig MJ. Eukaryotic ribosome display with in situ DNA recovery. *Nat Methods.* 2007; 4 (3): 281–8. DOI: 10.1038/nmeth1001. PubMed PMID: 17327849.
8. Benhar I, Reiter Y. Phage display of single-chain antibody constructs. *Curr Protoc Immunol.* 2002; Chapter 10: Unit 10 9B. DOI: 10.1002/0471142735.im1019bs48. PubMed PMID: 18432867.
9. Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif.* 2005; 41 (1): 207–34. PubMed PMID: 15915565.
10. Harmsen MM, Ruuls RC, Nijman IJ, Niewold TA, Frenken LG, de Geus B. Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features. *Mol Immunol.* 2000; 37 (10): 579–90. PubMed PMID: 11163394.
11. Avila F, Baily MP, Perelman P, Das PJ, Pontius J, Chowdhary R, et al. A comprehensive whole-genome integrated cytogenetic map for the alpaca (*Lama pacos*). *Cytogenet Genome Res.* 2014; 144 (3): 196–207. DOI: 10.1159/000370329. PubMed PMID: 25662411.
12. Grigoriadis A, Mackay A, Noel E, Wu PJ, Natrajan R, Frankum J, et al. Molecular characterisation of cell line models for triple-negative breast cancers. *BMC Genomics.* 2012; (13): 619. DOI: 10.1186/1471-2164-13-619. PubMed PMID: 23151021.
13. Deschacht N, De Groeve K, Vincke C, Raes G, De Baetselier P, Muyldermans S. A novel promiscuous class of camelid single-domain antibody contributes to the antigen-binding repertoire. *J Immunol.* 2010; 184 (10): 5696–704. DOI: 10.4049/jimmunol.0903722. PubMed PMID: 20404276.