

УДК 579.69: 577.12

М.В. ПАВЛОВА¹, Ю.С. НИКОЛАЕВ¹, Д.М. ИРОДОВ²,
О.В. ОКУНЕВ², В.А. КОРДЮМ², П.В. ГИЛЬЧУК²

¹ Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко

² Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

E-mail: gilchuk@ukr.net

ХАРАКТЕРИСТИКА ПАНЕЛИ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫХ АНТИТЕЛ МЫШИ ПРОТИВ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРФЕРОНА $\beta 1b$ ЧЕЛОВЕКА



*Из иммунной и неиммунной комбинаторных библиотек кДНК переменных генов иммуноглобулинов мыши получена панель одноцепочечных антител (ScFv's — single-chain Fv-antibodies) против рекомбинантного интерферона $\beta 1b$ человека (rhIFN- $\beta 1b$), которые были экспрессированы в клетках *Escherichia coli*. Для изолированных из иммунной библиотеки продуцентов показана разница в уровнях продукции ScFv's в периплазму и среду для культивирования, а также стабильность экспрессии при пересевах и хранении. После секвенирования целевой ДНК было проведено множественное выравнивание и структурный анализ последовательностей ScFv's с разной первичной структурой, в результате чего выявлены существенные отличия как в антиген-связывающих (CDR), так и в каркасных (FR) участках их переменных доменов. Методами ELISA и вестерн-блоттинга показана специфичность взаимодействия полученных из иммунной библиотеки ScFv's как с нативным, так и с денатурированным rhIFN- $\beta 1b$, а также их стабильность при хранении. Для каждого представителя панели ScFv's были определены константы аффинности, которые находились в диапазоне от $1,96 \cdot 10^{-8}$ до $1,69 \cdot 10^{-9}$ М.*

© М.В. ПАВЛОВА, Ю.С. НИКОЛАЕВ, Д.М. ИРОДОВ,
О.В. ОКУНЕВ, В.А. КОРДЮМ, П.В. ГИЛЬЧУК, 2008

Введение. Конструирование больших комбинаторных библиотек кДНК переменных генов иммуноглобулинов человека и животных, а также возможность изолирования с таких библиотек иммунореагентов с необходимыми антиген-связывающими характеристиками открыли принципиально новые возможности использования моноклональных антител в биологии и медицине [1, 2]. Наиболее распространенным форматом для конструирования рекомбинантных антител являются одноцепочечные антитела ScFv's, полученные путем трансляции объединенных в один ген переменных доменов тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов. Благодаря особенностям своей структуры ScFv's сохраняют конформацию активного центра природного антитела, что обеспечивает высокую специфичность их взаимодействия с антигеном [3]. Основным преимуществом ScFv's является возможность их продуцирования в клетках прокариотов с относительно небольшими затратами.

Качество полученных ScFv's определяется многими характеристиками, среди которых наиболее важными являются специфичность, растворимость, аффинность, стабильность и уровень экспрессии продуцентом. С использованием подходов генной и белковой инженерии можно получать ScFv's, которые с высокой селективностью распознают гомологичные белки или разные изоформы одного белка. В сочетании с известными методами селекции комбинаторных библиотек кДНК *in vitro*, такими как фаговый дисплей или дисплей рибосом, возможен направленный отбор ScFv's против конкретной антигенной детерминанты, что очень важно для определения характеристик биомолекул, а также для получения антител диагностического и терапевтического назначения [1, 4].

В большинстве случаев при селекции комбинаторных библиотек кДНК основной целью является получение ScFv's с высокими показателями аффинности, специфичности и стабильности, особенно когда планируется их дальнейшее применение *in vivo* [1, 3]. В случае необходимости распознавания нескольких эпитопов одного антигена или разных эпитопов пространственно сближенных антигенов повышение аффинности достигается конструированием мультивалентных форм рекомбинантных антител, которые имеют в своем сос-

таве одинаковые (миниантитела) или разные (гетероантитела) антиген-связывающие центры [5]. В ряде случаев возникает необходимость получения ScFv's, которые специфично распознают разные эпитопы или конформационные состояния целевого антигена, а также характеризуются высокой стабильностью и разными характеристиками связывания. Это позволяет значительно расширить потенциал использования ScFv's — от хроматографической очистки целевого антигена до его эффективной инактивации *in vivo* (в случае вирусных или опухолевых антигенов).

Однако необходимо учитывать возможность эффективного продуцирования полученных ScFv's в клетках прокариотов, что определяется особенностями их первичной структуры [3]. С учетом этого важным этапом является получение из комбинаторной библиотеки панели ScFv's против заданного антигена с целью дальнейшего отбора кандидатов молекул, которые отвечают всем необходимым требованиям.

Рекомбинантный интерферон $\beta 1b$ человека — это аналог природного цитокина, одобренный FDA (Food and Drug Administration, США) для лечения рассеянного склероза, вирусных заболеваний [6] и терапии некоторых форм рака [7]. Получение панели высокоспецифических ScFv's против rhIFN- $\beta 1b$ является актуальным как для исследования свойств упомянутого антигена, так и для мониторинга его концентрации *in vivo*.

В предыдущей работе нами была создана и охарактеризована комбинаторная библиотека кДНК V-генов иммуноглобулинов мышей, иммунизированных rhIFN- $\beta 1b$ [8]. Настоящая работа посвящена получению панели ScFv's против rhIFN- $\beta 1b$ из иммунной и неиммунной библиотек кДНК и определению их характеристик.

Материалы и методы. Для получения ScFv's против rhIFN- $\beta 1b$ использовали созданную ранее иммунную библиотеку кДНК V-генов иммуноглобулинов мыши [8], а также неиммунную библиотеку, любезно предоставленную для исследований А. Ламаном (Пушинский научный центр, РФ). Рекомбинантный интерферон $\beta 1b$, а также лизат клеток — продуцентов rhIFN- $\beta 1b$ получали на ПНДК «Фарм-

Биотек» (г. Киев). В работе использовали фаг-хелпер M13K07, штаммы *E. coli* TG1 и *E. coli* HB2151 из набора реактивов «Expression Module Recombinant Phage Antibody System» («GE Healthcare», США). Для экспрессии клонированных генов использовали фагмиду *pCANTAB 5E* и *pHEN-1*. В процедурах молекулярного клонирования применяли ферменты производства «Fermentas» (Литва). Манипуляции с ДНК проводили соответственно стандартным методам [9]. Для анализа блотов и статистической обработки полученных результатов использовали программы TotalLab 2.00 и OriginPro 7.0.

Аффинная селекция неиммунной библиотеки кДНК V-генов мыши. Для отбора ScFv's против rhIFN- $\beta 1b$ из неиммунной библиотеки использовали четыре схемы. В схемах I—III rhIFN- $\beta 1b$ (20 мкг/мл) иммобилизовали в лунках полистиролового планшета для ELISA («Nunc», Дания) и инкубировали 14 ч при 4 °С. Схема селекции IV состояла в том, что rhIFN- $\beta 1b$ был представлен для связывания с фагами через иммобилизованные поликлональные антитела против rhIFN- $\beta 1b$ («Sigma», США). После блокирования мест неспецифического связывания фосфатно-солевым буфером (PBS), который содержал 0,1 % твина 20 (PBST), в лунку вносили амплифицированные рекомбинантные фаги (10^{11} cfu) в буфере PBST и инкубировали 2 ч при 37 °С. Элюирование специфически связавшихся фагов проводили разными способами. В схеме I для элюирования использовали 0,1 М триэтаноламин, II — поликлональные антитела против rhIFN- $\beta 1b$, для схем III и IV — rhIFN- $\beta 1b$ в концентрации 50 мкг/мл.

Полученные фаги амплифицировали в *E. coli* штамма TG1 и использовали для последующих четырех циклов селекции по схеме, приведенной ранее.

Эффективность аффинного обогащения библиотеки определяли методом иммуноблоттинга реплик колоний.

Иммуноблоттинг реплик колоний. Полученными после аффинной селекции фагами инфицировали клетки *E. coli* штамма TG1, которые высевали на агаризованную среду 2YT, содержащую 100 мкг/мл ампициллина и 2 % глюкозы (2YTAG). Иммунохимический скри-

нинг клонов проводили с использованием метода, описанного нами в предыдущей работе [8]. В качестве первичных использовали моноклональные антитела Anti-C-мус 9E10 («Sigma»). Образовавшиеся иммунные комплексы проявляли вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена – HRP/Anti Mouse conjugate («ИМТЕК», РФ), как хромогенный субстрат использовали 4-хлоро-1-нафтол («Sigma»).

Клонирование ScFv-ДНК в pCANTAB 5E. Пул фагмид, полученный после аффинной селекции неиммунной библиотеки, использовали как матрицу для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами RS Primer Mix из набора реактивов «Mouse Module Recombinant Phage Antibody System» («GE Healthcare»). Полученную ScFv-ДНК (~750 п.н.) гидролизировали рестриктазами *SfiI* и *NotI*, лигировали с вектором *pCANTAB 5E* и использовали для трансформации *E. coli* штамма TG1.

Экспрессия ScFv's в *E. coli*. Изолированные из иммунной и неиммунной библиотек клоны *E. coli*, продуцирующие специфические ScFv's против rhIFN-β1b, наращивали при 30 °C в 2–50 мл до $A_{600} = 0,8$. Индукцию экспрессии проводили внесением ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ. Ферментацию ScFv's осуществляли в условиях интенсивной аэрации при 30 °C в течение 2–12 ч. После индукции клетки осаждали центрифугированием (10 мин, 4000 g), отбирали супернатант и получали фракции периплазмы для дальнейшего анализа в ELISA.

Секвенирование ДНК. Нуклеотидную последовательность ScFv's определяли методом Сенгера с использованием автоматического секвенатора ABI Prism 3130 («Applied Biosystems», США). ScFv-ДНК получали с помощью ПЦР с использованием праймеров pCANTAB-R1 5'-d [CCATGATTACGCCAAGCTTTGGAGCC]-3', pCANTAB-R2 5'-d [CGATCTAAAGTTTGTCTCTTTCC]-3' и рекомбинантных фагмид отобранных позитивных клонов как матрицы. Для секвенирования полученных ПЦР-продуктов (~1000 п.н.) использовали следующие праймеры pCANTAB 5-S3: 5'-d [GGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGG]-3'; pCANTAB 5-S4: 5'-d [CCAGAGCCACCTCCG

CCTGAACC]-3', pCANTAB 5-S1: 5'-d [CAACGTGAAAAAATTATTATTCGC]-3'; pCANTAB 5-S6: 5'-d [GTAAATGAATTTTCTGTATGAGG]-3'.

Для обработки и интерпретации результатов секвенирования использовали программу «Vector NTI» (Invitrogen). Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей переменных доменов проводили с помощью электронного ресурса IgBLAST Национального центра биотехнологической информации (NCBI).

Исследование связывания ScFv's с rhIFN-β1b.

1) **ELISA.** В лунках полистиролового планшета для ELISA («Titertek», США) иммобилизовали rhIFN-β1b (10 мкг/мл). Буфером PBST последовательно разводили пробы ScFv's, которые после блокирования мест неспецифического связывания вносили в соответствующие лунки и инкубировали 1 ч при 37 °C. Лунки промывали PBST и PBS, после чего проводили инкубацию с моноклональными антителами Anti-E-tag Antibody («GE Healthcare») в течение 1 ч при 37 °C. Образовавшиеся иммунные комплексы проявляли вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP/Anti Mouse conjugate, «ИМТЕК»), как хромогенный субстрат использовали ТМВ («Sigma»). После развития окраски реакцию останавливали внесением 1 М серной кислоты и измеряли величину адсорбции A_{450} на многоканальном фотометре Multiscan MCC/340 («Titertek», США).

2) **Вестерн-блоттинг.** Лизат клеток продуцента rhIFN-β1b после разделения в 15%-ном полиакриламидном геле с 0,1 % додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ) переносили на поверхность нитроцеллюлозной мембраны Nybound-C Extra («GE Healthcare»). Места неспецифического связывания белков блокировали буфером PBS, содержащим 0,3 % сухого обезжиренного молока (PBSM). Мембрану промывали буфером PBST, после чего в течение 1 ч инкубировали с разведенным в буфере PBSM экстрактом периплазмы соответствующего продуцента ScFv's. Мембрану промывали PBST и обрабатывали с использованием описанной системы иммунореагентов. Образовавшиеся иммунные комплексы визуализировали с помощью метода ECL с использованием рентгеновской пленки производства «AGFA» (Германия).

Определение уровня продукции ScFv's. Периплазматические экстракты, а также белки из культуральной среды продуцентов ScFv's разделяли в 15%-ном ДСН-ПААГ и переносили на поверхность нитроцеллюлозной мембраны для вестерн-блоттинга. Проявку мембраны осуществляли с использованием описанной системы иммунореагентов. Для количественного определения уровня продукции целевых белков использовали ScFv's с известной концентрацией. Полученные блоты сканировали и обсчитывали с использованием программы TotalLab 2.00.

Константу аффинности ScFv's определяли с помощью метода конкурентного ELISA, описанного в работе [10].

Результаты исследований и их обсуждение. В предыдущей работе нами описано создание и определение характеристик иммунной комбинаторной библиотеки кДНК V-генов мыши, с которой после аффинной селекции было изолировано ~30 продуцентов специфических к rhIFN-β1b ScFv's [8]. Также было показано, что полученные ScFv's специфически связываются

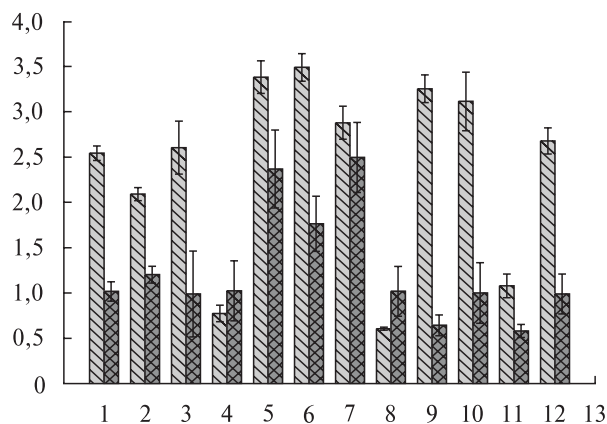


Рис. 1. Гистограмма уровней продукции специфических к rhIFN-β1b ScFv's в *E. coli*. Пробы периплазматических экстрактов и культуральных сред разных продуцентов после 3 ч индукции экспрессии разделены в 15%-ном ДСН-ПААГ, перенесены на нитроцеллюлозную мембрану и проявлены с использованием моноклональных Anti-E-tag антител и системы реагентов, описанных в разделе «Материалы и методы». Иммуноблоты обсчитаны с использованием программы TotalLab 2.00. $M \pm m$, $n = 4$; по вертикали – ScFv's, мг/л; по горизонтали – продуцент ScFv's. ▨ – периплазма, ▩ – культуральная среда

в ELISA с rhIFN-β1b и не распознают rhIFN-α2b, который является структурно и функционально подобным белком [11]. Однако неожиданным результатом стало то, что для всех полученных методом ПДРФ-анализа ScFv's было показано отсутствие гетерогенности их ДНК-последовательностей [8], что могло бы свидетельствовать про амплификацию одного клона во время селекции библиотеки. В то же время определенные ранее характеристики этой иммунной библиотеки, в частности, ее размер и высокое исходное разнообразие ScFv-ДНК, позволяли надеяться на получение панели ScFv's против rhIFN-β1b. Секвенирование ДНК нескольких десятков ScFv's представляет собой достаточно рутинную процедуру, поэтому для выявления ожидаемого разнообразия полученных ScFv's нами был использован следующий подход. Для 12 случайно отобранных позитивных клонов *E. coli* с использованием метода вестерн-блоттинга были определены такие характеристики, как стабильность экспрессии, уровень продукции, а также динамика накопления ScFv's после индукции экспрессии ИПТГ. Стабильность экспрессии ScFv's определяли путем многократных пересевов клонов-продуцентов с единичной колонии на агаризованной среде 2YTAG. После каждого посева в клон индукции экспрессию и определяли уровни продукции ScFv's в бактериальной периплазме и культуральной среде. Стабильная экспрессия ScFv's была показана всеми проанализированными продуцентами как минимум в течение четырех пассажей. Для всех 12 продуцентов также определены уровни накопления целевых ScFv's в периплазме (0,6–3,5 мг/л *E. coli*) и культуральной среде (0,6–2,5 мг/л *E. coli*) для вышеописанных условий ферментации (рис. 1). По результатам вестерн-блоттинга полученные продуценты по общему уровню синтеза ScFv's условно можно разделить на несколько групп: клоны с низким уровнем накопления ScFv's и тенденцией секреции в среду для культивирования (4#, 8#), клоны с высоким (1#, 2#, 3#, 5#, 6#, 9#, 10#, 12#) и низким (11#) уровнями продукции ScFv's и их накоплением преимущественно в периплазме (рис. 1).

С использованием метода вестерн-блоттинга также была исследована динамика накоп-

ления ScFv's разными клонами в течение 12 ч после начала индукции экспрессии. Показано, что уже на 4-м или 6-м часе в периплазме накапливается максимальное для упомянутого клона количество ScFv's, однако после 12 ч ферментации для некоторых клонов наблюдалось значительное снижение количества (1#, 4#, 6#, 7#, 9#) или отсутствие (8#, 11#) продукта необходимого размера (30 кДа). Последнее сопровождалось появлением фрагмента меньшего размера (~14 кДа) и свидетельствовало о частичной или полной деградации ScFv's во время продолжительного культивирования клонов в выбранных условиях (см. «Материалы и методы»). При этом полная деградация ScFv's наблюдалась только для клонов с низкими уровнями экспрессии (рис. 2). Из литературы известно, что определяющим фактором, который влияет на секрецию и уровень накопления ScFv's в *E. coli*, является их первичная структура [3]. Поэтому наличие нескольких разных групп продуцентов, в которых ScFv's стабильно продуцируются на определенном уровне, позволило сделать предположение о разнообразии выделенных из иммунной библиотеки кДНК и о перспективе получения панели ScFv's против rhIFN- β 1b. Для подтверждения этого предположения все проанализированные последовательности были секвенированы. Среди трех групп клонов с разными уровнями продукции ScFv's были выявлены четыре варианта ScFv-ДНК, которые кодируют разные полипептидные продукты – 1#, 2#, 4#, 11#.

После проведения структурного анализа полипептидных последовательностей полученных ScFv's были показаны существенные отличия в аминокислотном составе как для антиген-связывающих (CDR), так и для каркасных (FR) участков их переменных доменов (результаты не представлены).

Следующим заданием было изолирование специфических к rhIFN- β 1b ScFv's из неиммунной библиотеки кДНК V-генов мыши представленностью $\sim 10^8$ независимых клонов. Работа с неиммунной библиотекой имеет ряд преимуществ, среди которых – отсутствие этапа иммунизации животных и возможность использования одной библиотеки для получения ScFv's против разных антигенов (при

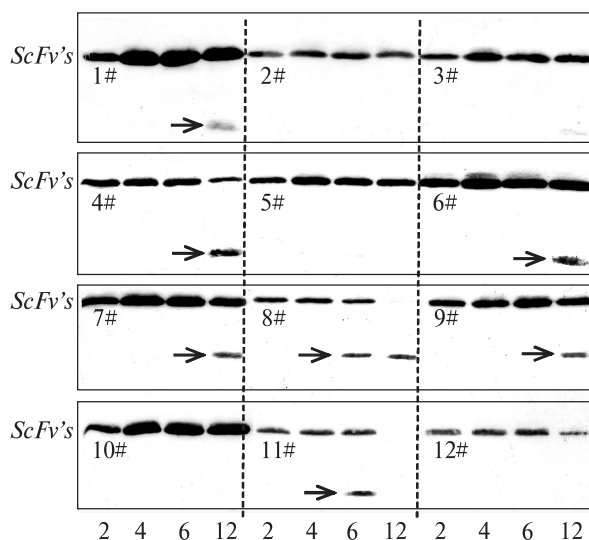


Рис. 2. Динамика накопления специфических к rhIFN- β 1b ScFv's в *E. coli*. Периплазматические экстракты продуцентов ScFv's, в которых индуцировали экспрессию в течение 2–12 ч (по горизонтали), были разделены в 15%-ном ДСН-ПААГ и проанализированы методом вестерн-блоттинга с использованием моноклональных Anti-E-tag антител. Стрелками обозначено положение продукта деградации (~14 кДа), # – номер клона-продуцента ScFv's. Приведены типичные данные трех независимых экспериментов

условии ее достаточного размера и разнообразия) [12]. В то же время изолированные из неиммунной библиотеки ScFv's могут иметь значительно более низкие показатели аффинности и стабильности по сравнению с ScFv's из иммунной библиотеки, что часто делает невозможным их дальнейшее практическое применение.

Разработка адекватной схемы селекции неиммунной библиотеки является важным этапом, который в дальнейшем будет определять качество полученных ScFv's. В настоящей работе для селекции неиммунной библиотеки использовали несколько разных схем (см. «Материалы и методы»), которые вместе с методом фагового дисплея обеспечили изолирование клонов *E. coli*, продуцирующих ScFv's против rhIFN- β 1b. Однако наиболее заметное обогащение библиотеки было достигнуто только в случае использования схемы, предусматривающей экспонирование rhIFN- β 1b через иммобилизованные поликлональные антитела и конкурентную эволюцию специфично связыва-

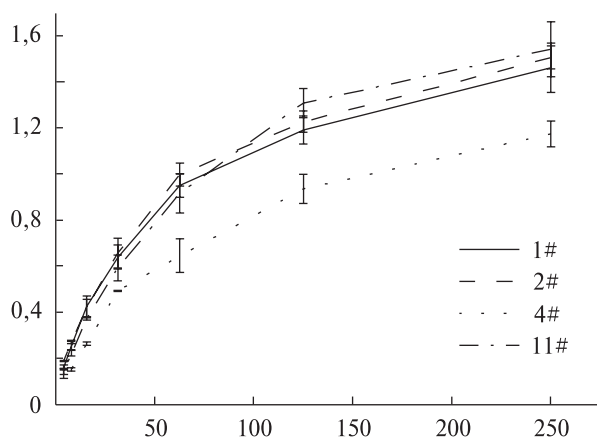


Рис. 3. Кривые связывания ScFv с иммобилизованным rhIFN-β1b в ELISA: 1, 2, 4, 11 – представители полученной из иммунной библиотеки панели ScFv's. Для детектирования иммунных комплексов использовали моноклональные Anti-E-tag антитела и систему реагентов, описанную в разделе «Материалы и методы». $M \pm m$, $n = 3$; по вертикали – A_{450} ; по горизонтали – ScFv's, нг/мл

шихся рекомбинантных фагов при помощи rhIFN-β1b (результаты не представлены).

Следует отметить, что конструкция вектора *pHEN-1*, использованного для клонирования при создании неиммунной библиотеки, предусматривает экспрессию ScFv's с С-концевой последовательностью аффинной метки С-мус. Для детекции таких ScFv's используются Anti-С-мус моноклональные антитела 9E10, которые менее чувствительны, чем Anti-E-tag мо-

ноклональные антитела, которые применялись нами для детекции ScFv's в иммунной библиотеке.

Поэтому, чтобы упростить дальнейший анализ, пул ScFv-ДНК, полученный из неиммунной библиотеки после ее обогащения по наиболее эффективной схеме, был переклонирован в вектор *pCANTAB 5E*. Последний предусматривает экспрессию ScFv's с С-концевой последовательностью E-tag.

По результатам повторного иммунохимического скринирования были отобраны клоны *E. coli*, продуцирующие ScFv's против rhIFN-β1b. Для нескольких позитивных клонов, отобранных для дальнейшего анализа, показан низкий уровень продукции ScFv's, который составлял < 0,1 мг/л *E. coli*, и существенный лизис клеток-продуцентов после индукции экспрессии в течение 3 ч (результаты не представлены).

Показано также, что изолированные из неиммунной библиотеки ScFv's имеют низкую активность связывания с rhIFN-β1b в ELISA. Учитывая это, в дальнейшем мы сосредоточили наше внимание на панели ScFv's против rhIFN-β1b, изолированных из иммунной библиотеки.

Методом непрямого ELISA исследовано связывание разных разведений ScFv's с нативным rhIFN-β1b. В качестве источника ScFv's использовали фракцию периплазмы клеток-продуцентов после индукции экспрессии, в

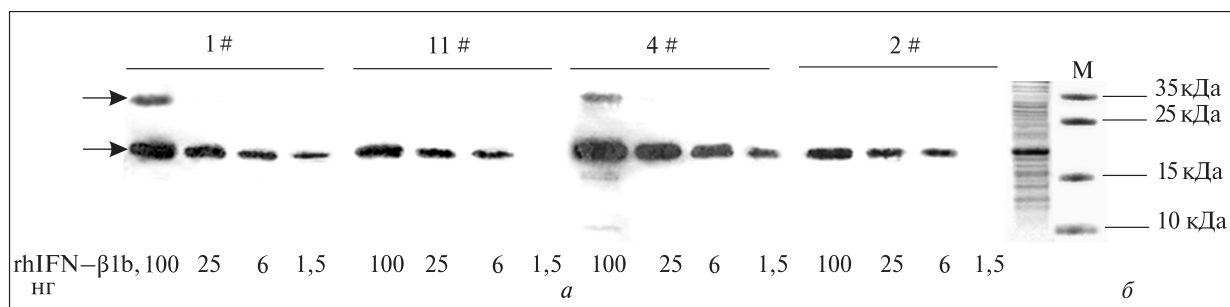


Рис. 4. Электрофореграмма тотального лизата клеток-продуцентов rhIFN-β1b (б) и иммуноблот (а), проявленный с использованием ScFv's. Лизат бактериальных клеток-продуцентов rhIFN-β1b был разделен в 15%-ном ДСН-ПААГ, перенесен на нитроцеллюлозную мембрану и проявлен с использованием периплазматических экстрактов соответствующих продуцентов ScFv's. Концентрация ScFv's в каждом случае составляла 560 нг/мл. Образовавшиеся иммунные комплексы визуализировали с использованием метода ECL и рентгеновской пленки «AGFA», время экспозиции 30 с; 1, 2, 4, 11 – представители полученной панели ScFv's. Обозначено количество rhIFN-β1b, нанесенное на дорожку. Стрелками обозначено положение мономерной (~18 кДа) и димерной (~36 кДа) форм rhIFN-β1b.

Приведены типичные данные трех независимых экспериментов

которой методом вестерн-блоттинга предварительно определяли концентрацию целевого белка. Для всех представителей панели была показана высокая антиген-связывающая активность, которая оказалась несколько более низкой для ScFv's клона 4# (рис. 3).

Минимальная концентрация ScFv's, при которой наблюдался достоверный сигнал в ELISA при применении описанной системы реагентов (см. «Материалы и методы»), составляла от 3,91 до 7,81 нг/мл. Кроме того, ScFv's не теряли иммунологической активности при долгосрочном хранении периплазматических экстрактов в виде замороженных стоков ($t = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$), что свидетельствует об их высокой стабильности.

Связывание полученных ScFv's с денатурированным rhIFN- β 1b анализировали методом вестерн-блоттинга. Для этого белки тотального лизата клеток-продуцентов rhIFN- β 1b разделяли в ДСН-ПААГ и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Для выявления rhIFN- β 1b использовали разведенные периплазматические экстракты соответствующих продуцентов, концентрация ScFv's в которых составляла 560 нг/мл.

Показано, что ScFv's клонов 1# и 4# способны выявлять rhIFN- β 1b в количестве, меньшем чем 1,5 нг в случае использования описанной системы реагентов для проявления блотов (рис. 4). Кроме того обнаружено, что все полученные ScFv's также связывались с белком 36 кДа, который, как было позднее показано с использованием специфических поликлональных антител, является димерной формой rhIFN- β 1b.

Интересным фактом оказалась разница в чувствительности представителей полученной панели ScFv's по отношению к нативному и денатурированному rhIFN- β 1b. Так, ScFv's клонов 2# и 11# в одинаковой концентрации не выявляли 1,56 нг денатурированного rhIFN- β 1b, хотя с более высокой активностью (по отношению к другим представителям панели) связывались с rhIFN- β 1b в ELISA (рис. 3). ScFv's клон 4# проявили самую низкую антиген-связывающую активность в ELISA, но с более высокой относительно других ScFv's чувствительностью распознавали денатурированный rhIFN- β 1b.

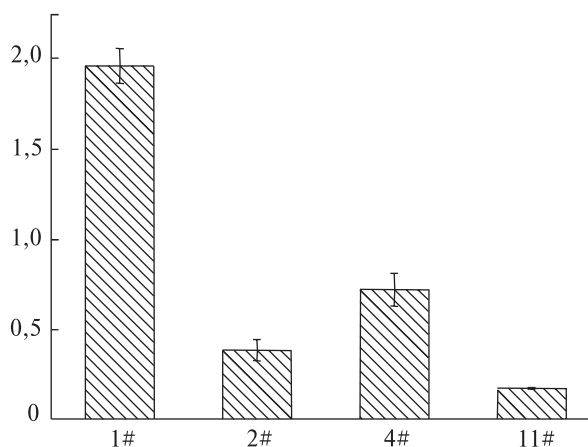


Рис. 5. Сравнение констант аффинности представителей полученной панели ScFv's (по горизонтали); по вертикали – $K_{аф} \cdot 10^{-8}$, М

Относительные различия в иммунологической активности представителей полученной панели ScFv's к нативному и денатурированному rhIFN- β 1b можно объяснить разной эпитопной специфичностью ScFv's, однако высказанное предположение требует дальнейшего экспериментального подтверждения.

Высокие показатели аффинности всегда являются желательной характеристикой, особенно для диагностических антител [1, 3]. Для всех представителей панели ScFv's была определена $K_{аф}$ (рис. 5).

Следует отметить, что полученный диапазон $K_{аф}$ ScFv's (от $1,96 \cdot 10^{-8}$ М до $1,69 \cdot 10^{-9}$ М) достаточно узкий и не содержит другие, теоретически возможные при работе с иммунными библиотеками, показатели аффинности. Такие результаты можно объяснить как особенностями использованной нами системы дисплея ScFv's, так и специфичностью выбранного нами метода селекции фаговой библиотеки.

Так, данная система дисплея не является моновалентной, поскольку при экспрессии на поверхности фага могут экспонироваться от одной до пяти копий ScFv's [13]. Это очень усложняет отбор ScFv's по показателям аффинности и может привести к потере высокоаффинных ScFv's в случае использования недостаточно жестких условий элюирования на этапе селекции фаговой библиотеки. В то же время отсутствие ScFv's с низкими $K_{аф}$ мо-

жет быть результатом потери их в случае преобладающего связывания с антигеном высокоаффинных представителей на этапе селекции фаговой библиотеки. Это в значительной степени зависит как от соотношения разных ScFv's в исходной библиотеке, так и от концентрации антигена при проведении ее аффинной селекции [3].

Выводы. Получена панель ScFv's против rhIFN-β1b с высокими показателями специфичности, аффинности и стабильности при хранении.

Показана стабильная продукция ScFv's в *E. coli* и определены уровни их экспрессии. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования данных ScFv's с диагностическими целями для иммунохимического обнаружения rhIFN-β1b с высокой чувствительностью.

Авторы работы выражают благодарность А. Ламану за предоставленную для исследований неиммунную библиотеку ScFv's мыши, а также сотрудникам отдела функциональной геномики ИМБиг НАН Украины за секвенирование ДНК.

*M.V. Pavlova, I.S. Nikolaiev, D.M. Irodov,
O.V. Okunev, V.A. Kordium, P.V. Gilchuk*

CHARACTERIZATION OF A PANEL OF MOUSE SINGLE-CHAIN ANTIBODIES AGAINST RECOMBINANT HUMAN INTERFERON β1b

A panel of single-chain antibodies (ScFv's – single-chain Fv-antibodies) against recombinant human interferon beta 1b (rhIFN-β1b) has been obtained from immune and naïve combinatorial cDNA libraries of the mouse variable immunoglobulin genes. ScFv's were expressed into *Escherichia coli* cells. For producers isolated from the immune library a difference in production yield of ScFv's in periplasm and incubation medium as well as their expression stability in passages and storage stability have been demonstrated. After sequencing of target DNA the multiple alignment and structural analysis of ScFv's sequences with different primary structures were carried out and significant difference in both complementarity-determining (CDR) and framework (FR) regions of their variable domains has been shown. For the ScFv's isolated from the immune library, specificity of their binding with native and denatured rhIFN-β1b in ELISA and Western-blotting as well as their high storage stability have been shown. The affinity constants for each representatives of the ScFv's panel were in the range from $1.96 \cdot 10^{-8}$ to $1.69 \cdot 10^{-9}$ M.

*M.V. Павлова, Ю.С. Николаев, Д.М. Иродов,
О.В. Окунев, В.А. Кордюм, П.В. Гильчук*

ХАРАКТЕРИСТИКА ПАНЕЛИ ОДНОЛАНЦЮГОВИХ АНТИТІЛ МИШІ ПРОТИ РЕКОМБІНАНТНОГО ІНТЕРФЕРОНУ β1b ЛЮДИНИ

З імунної та неімунної комбінаторних бібліотек ДНК варіабельних генів імуноглобулінів миші одержано панель одноланцюгових антитіл (ScFv's – single-chain Fv-antibodies) проти рекомбінантного інтерферону β1b людини (rhIFN-β1b), які експресовано в клітинах *Escherichia coli*. Для ізольованих з імунної бібліотеки продуцентів показано різницю у рівнях продукції ScFv's до периплазми та середовища культивування, а також стабільність експресії при пересівах та зберіганні. Після секвенування цільової ДНК проведено множинне вирівнювання та структурний аналіз послідовностей ScFv's з різною первинною структурою, в результаті чого було виявлено істотні відмінності як у антигенз'язувальних (CDR), так і у каркасних (FR) ділянках їхніх варіабельних доменів. Методиками ELISA та вестерн-блотингу показано специфічність взаємодії одержаних з імунної бібліотеки ScFv's як з нативним, так і денатурованим rhIFN-β1b, а також їхню стабільність при зберіганні. Для кожного представника панелі ScFv's встановлено константи афінності, які знаходились у діапазоні від $1,96 \cdot 10^{-8}$ до $1,69 \cdot 10^{-9}$ М.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Moroney S., Pluckthun A. Modern antibody technology : The impact on drug development // Modern Biopharmaceuticals / Ed. J. Knablein. – Weinheim : Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, 2005. – 4. – P. 1147–1186.
2. Filipula D. Antibody engineering and modification technologies // Biomol. Eng. – 2007. – 24, № 2. – P. 201–215.
3. Bradbury A., Marks J.D. Antibodies from Phage antibody libraries // J. Immun. Meth. – 2004. – 290. – P. 29–49.
4. Parsons H.L., Earnshaw J.C., Wilton J. Johnson K.S., Schueler P.A., Mahoney W., McCafferty J. Directing phage selections towards specific epitopes // Protein Eng. – 1996. – 9, № 11. – P. 1043–1049.
5. Holliger P., Hudson P.J. Engineering antibody fragments and the rise of single domains // Nature Biotech. – 2005. – 23, № 9. – P. 1126–1136.
6. Tyring S.K. Interferons: biochemistry and mechanisms of action // Amer. J. Obstet. Gynecol. – 1995. – 172. – P. 1350–1353.
7. Damdinsuren B., Nagano H., Wada H., Kondo M., Ota H., Nakamura M., Noda T., Natsag J., Yamamoto H., Doki Y., Umeshita K., Dono K., Nakamori S., Sakon M., Monden M. Stronger growth-inhibitory effect of inter-

- feron (IFN)-beta compared to IFN-alpha is mediated by IFN signaling pathway in hepatocellular carcinoma cells // *Int. J. Oncol.* – 2007. – **30**, № 1. – P. 201–208.
8. Павлова М.В., Гільчук П.В., Похолоенко Я.О., Ніколаєв Ю.С., Кордюм В.А. Створення та характеристика імунної комбінаторної бібліотеки κДНК варіабельних генів імуноглобулінів миші // *Цитология и генетика.* – 2008. – **42**, № 2. – С. 10–15.
 9. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual.* – Cold Spring Harbor Laboratory (Second edition). – 1989. – vol. 1.
 10. Friguet B., Chaffotte A.F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M.E. Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay // *J. Immun. Meth.* – 1985. – **77**, № 2. – P. 305–319.
 11. Karpusas M., Whitty A., Runkel L., Hochman P. The structure of human interferon-beta: implications for activity // *Cell. Mol. Life. Sci.* – 1998. – **54**, № 11. – P. 1203–1216.
 12. Sheets M.D., Amersdorfer P., Finnern R., Sargent P., Lindquist E., Schier R., Hemingsen G., Wong C., Gerhart J.C., Marks J.D. Efficient construction of a large non-immune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1998. – **95**, № 11. – P. 6157–6162.
 13. Smith G.P., Petrenko V.A. Phage display // *Chem. Rev.* – 1997. – **97**, № 2. – P. 391–410.

Поступила 26.10.07