ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ СТАТТІ

УДК 602.68

ХАРАКТЕРИСТИКА scFv-АНТИТІЛ ПРОТИ ДИФТЕРІЙНОГО ТОКСИНУ, ВИДІЛЕНИХ З ІМУННОЇ ТА НЕІМУННОЇ БІБЛІОТЕК ІМУНОГЛОБУЛІНОВИХ ГЕНІВ

О. С. Олійник
Д. В. Колибо
С. В. Комісаренко

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

E-mail: lenaoliinyk@mail.ru

Дифтерійний токсин відіграє провідну роль у розвитку дифтерійної інфекції, тому антитіла проти токсину активно використовують при діагностиці та лікуванні дифтерії. Нами раніше із наївної та імунної бібліотек імуноглобулінових генів миші було відібрано ряд scFv-антитіл проти субодиниці В дифтерійного токсину. Метою цієї роботи було охарактеризувати ряд важливих властивостей отриманих scFv.

Рестриктним аналізом підтверджено, що scFv-антитіла, відібрані після одного раунду селекції з імунної бібліотеки, відрізняються один від одного, тобто усі відібрані послідовності є унікальними. Було підтверджено, що scFv-антитіла, виділені з імунної бібліотеки, є специфічними саме до послідовності фрагмента В дифтерійного токсину. Вестерн-блот-аналіз клонів, отриманих після субклонування ДНК-послідовностей scFv у векторі p*ET-22b*, показав, що цільовий протеїн експресується переважно в нерозчинній формі. Одержані результати підтвердили, що було відібрано ряд клонів-продуцентів гетерогенних scFv, специфічних до послідовності дифтерійного токсину, які надалі можуть бути використані для розроблення діагностичних та терапевтичних протидифтерійних препаратів нового покоління.

Ключові слова: scFv-антитіла, дифтерійний токсин, неімунні та імунні бібліотеки імуноглобулінових генів.

До масового впровадження вакцинації періодичні спалахи захворюваності на дифтерію мали епідемічний характер і відзначались високою смертністю. Відомо про великі епідемії дифтерії в Іспанії на початку XVII ст., у Новій Англії в 1730-ті рр., у Західній Європі впродовж 1850–1890 рр. [1]. Проте й на початку XX ст. дифтерія все ще лишалась надзвичайно тяжкою хворобою: протягом 20-х рр. захворюваність на дифтерію у США та Канаді становила близько 150 випадків на 100 000 населення, а в Західній Європі під час II Світової війни кількість хворих на 100 000 населення складала 212 у Німеччині, 760 — у Норвегії та 622 — у Голландії [2]. Хворіли на дифтерію не лише люди з низьким рівнем життя. Відомо, наприклад, що від цієї хвороби померли дочка та онуки англійської королеви Вікторії [3], а у двох американських президентів, Гловера Клівленда та Абрахама Лінкольна, — діти [4].

Упровадження масової імунізації дифтерійним анатоксином дозволило різко скоротити захворюваність на дифтерію [1], що давало підстави вірити у перемогу над цією хворобою. Однак навіть в умовах масової вакцинації періодично спостерігалися незначні спалахи дифтерії. Обмежені осередки виникали у країнах з неоднаковим рівнем економічного розвитку й на різних континентах, зокрема у Китаї, Еквадорі, Судані, Лесото, Ємені, США, Швеції [2]. У 90-х рр. на території колишнього СРСР спалахнула епідемія, яка показала, що дифтерія, як і раніше, залишається однією з найнебезпечніших інфекційних хвороб. Під час цієї епідемії в регіоні було зафіксовано близько 150 000 випадків захворювання, майже 5 000 з яких закінчились летально [4], хвороба набула поширення на величезній території [5]. Епідемія 90-х рр. засвідчила, що знання про епідеміологію дифтерії є неповними [6], а чинники, які зумовлюють періодичні спалахи дифтерії, залишаються не зрозумілими [1, 5, 7]. Під час епідемії 90-х рр. XX ст. Україна перебувала

в епіцентрі подій, за цей період, згідно зі статистичними даними ВООЗ, на території України було зафіксовано понад 20 000 випадків дифтерії.

Останніми роками епідемічна ситуація стабілізувалась. Але, на жаль, випадки дифтерії все ще регулярно трапляються, і Україна зберігає сумну належність до країн з найвищою захворюваністю на дифтерію. Так, згідно зі статистичними даними, які наводить Міністерство охорони здоров'я, у 2004 р. в країні було зафіксовано 123 випадки (з них 2 летальні), у 2005 — 99 випадків (2 летальні), у 2006 — 52 випадки (жодного летального), у 2007 — 66 випадків (4 летальні), у 2008 — 55 випадків, з яких 6 були летальними. Тенденція до постійного скорочення рівня захворюваності, що спостерігалася починаючи з 1995 р., в останні роки вже не простежується. А це дає підстави припускати, що в найближчі роки ситуація навряд чи покращиться, тобто з'являтимуться нові хворі, що потребуватимуть ефективного лікування і точної та швидкої діагностики. Постійна присутність інфекції у популяції за несприятливих умов може призвести до швидкого поширення дифтерії та появи нової епідемії. Крім того, Україна залишається резервуаром дифтерійної інфекції для країн Європи. Саме тому розроблення та впровадження ефективних засобів профілактики, діагностики і терапії дифтерії для України є вкрай важливими.

Відповідальним за основні прояви та ускладнення при дифтерії є екзотоксин, що синтезується збудником [8], тому антитіла до дифтерійного токсину активно використовують у діагностиці та терапії дифтерії. Антитіла у форматі одноланцюгових варіабельних фрагментів (scFv) мають низку особливостей, зокрема таких, як відносно низька імуногенність, простота отримання, моноклональна природа [9], завдяки яким scFv можуть стати надзвичайно перспективними в діагностиці та терапії дифтерії. ScFv можна отримати, використовуючи як джерело генетичного матеріалу клітини гібридоми — продуцента моноклональних антитіл, або виділити із бібліотек імуноглобулінових генів, донорами яких є імунізовані чи не імунізовані тварини і людина.

Оскільки неімунні бібліотеки мають бути придатними для відбору антитіл до широкого кола антигенів, потрібно, щоб вони містили достатньо велику кількість функціонально-активних антигензв'язувальних протеїнів. Тому ці бібліотеки зазвичай досить великі і містять не менше 10(8)–10(9) клонів [10–12]. Першим критичним етапом у процесі створення наївних бібліотек є підбір праймерів для ампліфікації максимальної можливої кількості різних V-генів. Попри те, що на цей час розроблено ряд наборів праймерів для ампліфікації VH- та VL-послідовностей, питання про оптимальний склад таких наборів залишається дискусійним [13]. Інша проблема постає в разі об'єднання VH- та VL-доменів. Унаслідок низької продуктивності цієї процедури частина V-генів так і не потрапляє до бібліотеки, також можливе некоректне об'єднання деяких VH- та VL-генів, що призводить до зсуву рамки зчитування і, як результат, до зниження якості бібліотеки [13]. Другим критичним етапом під час створення бібліотек є гідроліз ампліфікованих фрагментів за допомогою ендонуклеаз рестрикції. Через низький вихід процедур рестрикції та лігування частина V-генів незворотно втрачається на цих етапах [14]. Урешті-решт, розміри бібліотеки лімітуються максимально можливою ефективністю трансформації бактерій, через що при конструюванні великих наївних бібліотек зазвичай отримують суббібліотеки, які згодом об'єднують [10–12]. На жаль, існує велика різниця між закодованим у бібліотеці різноманіттям генів та молекул протеїнів, що репрезентуються під час відбору. З різних причин, таких як токсичність для бактеріальних клітин, некоректний фолдинг, протеоліз та деяких інших, частина навіть коректних послідовностей V-генів залишається недоступною для відбору [15]. Усе це робить процес одержання антитіл із наївних бібліотек достатньо складним.

Імунні бібліотеки отримують від донорів, штучно чи природно імунізованих певним антигеном. Основними властивостями таких бібліотек є те, що завдяки попередній імунізації донора бібліотека збагачується генами антитіл, специфічних до цільового антигену, причому частина таких антитіл пройшли афінне дозрівання в організмі і тому мають високу спорідненість до антигену [15]. З імунних бібліотек можна одержати велику кількість різноманітних антитіл проти цільового антигену, включаючи такі, що мають унікальні специфічні властивості, чого фактично неможливо досягти під час роботи з наївними бібліотеками [16]. При цьому високих результатів вдається досягти навіть у разі невеликих, представленістю лише 10 (4) клонів, імунних бібліотек [17]. Тому отримання специфічних антитіл з імунних бібліотек порівняно з наївними є ефективним, відносно простим підходом, що потре-

бує менших затрат реактивів та зусиль. Основний недолік таких бібліотек полягає в тому, що вони придатні для відбору антитіл лише до одного антигену, тому, коли виникає потреба в антитілах іншої специфічності, як правило, доводиться конструювати нову імунну бібліотеку [18].

Раніше ми виділили специфічні до дифтерійного токсину (його В- фрагмента) scFv як з імунної, так і з неімунної (наївної) бібліотек імуноглобулінових генів [19, 20].

Метою роботи було дослідити основні характеристики отриманих рекомбінантних фрагментів антитіл, порівняти їхні властивості та проаналізувати ефективність стратегій відбору рекомбінантних антитіл із наївних та імунних імуноглобулінових бібліотек на прикладі одержаних нами scFv до субодиниці В дифтерійного токсину.

Матеріали і методи

У роботі використовували імунохімічні реактиви виробництва Sigma (США), ензими для ампліфікації, рестрикції та лігування ДНК — Fermentas (Литва), нітроцелюлозну мембрану HiBond C-Extra — Amersham (США), солі та кислоти — Merk (Німеччина). Вісім антитіл було отримано з імунної бібліотеки (клони scFv14, scFv30, scFv42, scFv51, scFv56, scFv61, scFv94 та scFv120) та раніше субклоновано у векторі p*ET-22b* [20], одне scFv-антитіло відібрано з наївної бібліотеки (scFv II-15) [19]. Процедури ампліфікації, рестрикції та лігування ДНК-фрагментів проводили згідно з методиками, описаними в [21], а також відповідно до рекомендацій виробників реактивів.

Субклонування послідовності scFv II-15 проводили, як описано раніше для scFv, відібраних з імунної бібліотеки [20].

Аналіз різноманітності scFv, відібраних з імунної бібліотеки. ДНК-послідовності scFv ампліфікували за допомогою праймерів, специфічних до ділянки t7-промотора (5′-taatacgactcactatagggg-3′) та t7-термінатора (5′-tagttattgctcagcggtggc-3′) плазміди pET. Ампліфіковані фрагменти очищали та гідролізували ендонуклеазою рестрикції *Mva*I. Отримані рестриктні фрагменти аналізували у 1,5%-му агарозному гелі.

Субклонування послідовності субодиниці В дифтерійного токсину з вектора pET-24a у вектор pGEX-4T-1. Плазміду p*ET-24a*, що містить послідовність субодиниці В дифтерійного токсину, методом лужного лізису виділяли з отриманого раніше штаму-продуцента [22], обробляли ендонуклеазами рестрикції *Bam*HI і *Xho*I та розділяли отримані рестриктні фрагменти в 1% агарозному гелі. Фрагмент, що відповідає ДНК-послідовності субодиниці В, виділяли з гелю та лігували з гідролізованою *Bam*HI/*Xho*I плазмідою p*GEX-4T-1*. Одержаною лігазною сумішшю трансформували компетентні клітини *E. coli BL-21(DE3*) та відбирали штам, що продукує рекомбінантний протеїн, маса якого відповідає масі рекомбінантної субодиниці В, об'єднаної з GST-тагом, що кодується p*GEX-4T-1*.

Імуноблотинг. Для аналізу експресії scFv у розчинній та нерозчинній фракціях бактеріальних протеїнів отримували відповідні клітинні екстракти, як описано раніше [20]. Із середовища інкубування протеїни осаджували трихлороцтовою кислотою, для чого середовище відділяли від клітин, додавали до 1 мл трихлороцтову кислоту до кінцевої концентрації 12,5%, інкубували протягом 30 хв, після чого центрифугували 20 хв за 11 000 об/хв і двічі промивали 1 мл ацетону. Одержані екстракти розділяли в 10%-му ПААГ у присутності ДСН [23] та переносили на нітроцелюлозну мембрану, яку протягом 1 год при 37° С витримували у 5%-му розчині знежиреного молока в ЗФР (0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,144% Na_2HPO_4, 0,024% KH_2PO_4, pH 7,4). Після цього мембрану промивали й переносили в розчин антитіл проти маркерної послідовності, злитої з scFv, у буфері ТФБ (ЗФР, що містить 0,04% Твін-20). Через 1 год інкубації при 37° С її знову промивали й переносили в розчин антитіл проти мишачих імуноглобулінів, кон'югованих з пероксидазою хрону. Після інкубації впродовж 1 год при 37° С мембрану промивали й переносили в розчин для проявлення (0,06%-го діамінобензидин, 0,001%-й пероксид водню).

Для аналізу розпізнавання субодиниці В дифтерійного токсину scFv-антитілами використовували лізат штаму продуцента, що був отриманий після субклонування ДНК-послідовності субодиниці В у векторі p*GEX-4T-1*. Клітинний лізат розділяли в 10%-му ПААГ у присутності ДСН і переносили на нітроцелюлозну мембрану. Мембрану витримували в 5%-му розчині знежиреного молока в ЗФР протягом 1 год при 37° С, після чого промивали й переносили в розчин scFv відповідних клонів у ТФБ та інкубували 1 год при 37° С. Потім мембрану промивали і проводили наступні етапи так, як описано вище для визначення scFv у різних клітинних екстрактах.

Результати та обговорення

Антигензв'язувальний сайт антитіла формують варіабельні домени легкого та важкого імуноглобулінових ланцюгів (VH- та VL-домени). Під час розвитку В-лімфоцитів унікальна послідовність кожного з варіабельних доменів утворюється внаслідок складного процесу рекомбінації між сегментами імуноглобулінових генів. Це зумовлює формування цілої низки різних антигензв'язувальних фрагментів та утворення набору наївних В-клітин, кожна з яких експресує на своїй поверхні унікальне антитіло. З появою антигену із цього набору відбираються В-клітини, що продукують специфічні до антигену антитіла, а подальший запуск соматичного гіпермутагенезу V-генів забезпечує появу та відбір більш афінних клонів. Після отримання антитіл з імуноглобулінових бібліотек доводиться штучно відбирати специфічні клони. При цьому основним завданням є поєднати фенотип — молекулу протеїну, що взаємодіє з антигеном, та генотип — послідовність ДНК, яка кодує таку молекулу. На сьогодні розроблено низку методів селекції антитіл необхідної специфічності [16]. Одним з таких методів є фаговий дисплей [24]. Цей підхід засновано на використанні рекомбінантних фагів *E. coli*, що експонують на своїй поверхні фрагменти антитіл, об'єднані з одним із фагових протеїнів. Усередині таких фагових частинок міститься носій генетичної інформації, який несе ДНК-послідовність фрагмента антитіла. Оскільки фаги експонують на поверхні антигензв'язувальну молекулу певної специфічності, можна відібрати ті фагові частинки, які кодують антитіла, що здатні взаємодіяти з цільовим антигеном. Після зараження відібраними фагами ДНК-носій потрапляє до бактеріальних клітин і ті набувають здатності експресувати відповідні антигензв'язувальні молекули. Водночас клітини-носії фагміди можна інфікувати фагом-хелпером (чи фагом дикого типу), що спричинює формування фагів, частина яких нестиме фагмідну ДНК усередині, та scFv, що міститься на поверхні [25]. Отриманий у такий спосіб пул фагів, очевидно, буде збагачений фагами-носіями специфічних до цільового антигену scFv, і в разі проведення нового раунду селекції вірогідність відбору специфічних scFv зростатиме [16]. Разом з тим, оскільки перед кожним новим раундом селекції фагові частинки ампліфікуються у клітинах *E. coli,* це зумовлює появу багатьох копій кожного з варіантів частинок. Тому під час проведення кількох раундів селекції існує можливість відібрати декілька клонів, що насправді несуть одну й ту саму генетичну послідовність.

Аналізуючи успішність процесу відбору scFv-антитіл, слід охарактеризувати різноманітність отриманих клонів та виявити тотожні копії. Крім безпосередньої процедури секвенування ДНК-послідовностей, використовують також непрямі методи, що можуть підтверджувати різноманітність отриманих клонів. Серед таких методів часто застосовують процедуру рестриктного аналізу, зокрема рестриктазою *Mva*I, що має сайт рестрикції 5′-C C^A G G-3′, який набув великого поширення. Рестриктний аналіз ендонуклеазою *Mva*I восьми клонів scFv, відібраних нами з імунної бібліотеки, показав, що для кожної ДНК-послідовності було отримано різні за розміром рестриктні фрагменти, а це можливо лише тоді, коли нуклеотидні послідовності окремих scFv відрізняються (рис. 1). Отже, як ми й припускали раніше [20], вдалося відібрати з імунної бібліотеки вісім різних клонів, специфічних до субодиниці В дифтерійного токсину.

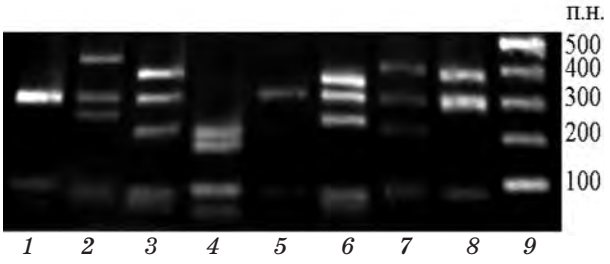

Рис. 1. **Рестриктний аналіз гетерогенності ДНК-послідовностей scFv, відібраних з імунної бібліотеки:**
1 — клон scFv14; *2* — клон scFv30; *3* — клон scFv42; *4* — клон scFv51; *5* — клон scFv56; *6* — клон scFv61; *7* — клон scFv94; *8* — клон scFv120; *9* — маркери

На нашу думку, гетерогенні клони вдалося відібрати тому, що селекцію проводили протягом одного раунду. Це дало змогу уникнути копіювання одних і тих самих клонів на кожному новому етапі селекції і таким чином відбирати лише унікальні послідовності. Імовірно, такий підхід — проведення відбору за один раунд селекції — є найбільш ефективним для отримання індивідуальних незалежних клонів. Разом з тим і наші результати, і дослідження інших авторів [26, 27] показують, що під час роботи з імунними бібліотеками вже після першого раунду селекції можна одержати велику кількість високоафінних scFv-антитіл. Отже, очевидно, така стратегія є оп-

тимальною у процесі відбору рекомбінантних антитіл з імунних бібліотек.

Як відомо, рекомбінантні протеїни можуть відрізнятися від природних антигенів наявністю специфічних маркерних послідовностей — тагів, що є їхніми структурними компонентами, закодованими у відповідному векторі. У разі застосування рекомбінантних антигенів для індукції імунної відповіді, а також для селекції scFv-антитіл з бібліотек можна очікувати отримання антитіл, специфічних саме до цих маркерних послідовностей, які даватимуть хибні позитивні результати розпізнавання цільової послідовності протеїну. Щоб виключити вплив таких антитіл на результати аналізу специфічності отриманих клонів scFv-антитіл, ми використали підхід, що дозволив уникнути роботи з дифтерійним токсином — бактеріальним фактором патогенності, який становить потенційну небезпеку. Для цього ми субклонували послідовність субодиниці B у векторі p*GEX-4T-1*, що дає змогу експресувати B-субодиницю, яка містить в N-кінцевій послідовності GST-таг (Glutathione S-transferase). Отриману за допомогою цього вектора B-субодиницю використовували для аналізу специфічності одержаних клонів scFv-антитіл. Натомість рекомбінантна субодиниця B, що була застосована для селекції scFv-антитіл, експресувалась у векторі p*ET-24a*. Така B-субодиниця містила послідовність лідерного пептиду T7-фага в N-кінцевій частині і послідовність полігістидинового тага в C-кінцевій частині. Оскільки ці дві плазміди (p*GEX-4T-1* та p*ET-24a*) кодують різні маркерні послідовності, що синтезуються разом із рекомбінантним протеїном, варіанти рекомбінантної субодиниці B, експресовані в цих векторах, мають спільною лише цільову послідовність, яка відповідає саме фрагменту B нативного дифтерійного токсину. Імуноблотинг клітинного лізату клону-продуцента субодиниці B, клонованої у p*GEX-4T-1*, свідчить про те, що всі вісім клонів, виділених з імунної бібліотеки, взаємодіють зі смугою, яка відповідає субодиниці B, злитій з GST-тагом (рис. 2). Отже, результати імуноблотингу підтвердили специфічність відібраних scFv до цільової послідовності. Крім того, цей дослід показав, що отримані scFv здатні розпізнавати субодиницю B не лише у твердофазному імуноензимному аналізі, але й в імуноблотингу. Це опосередковано свідчить про те, що вони розпізнають лінійні, а не конформаційні епітопи у структурі молекули токсину.

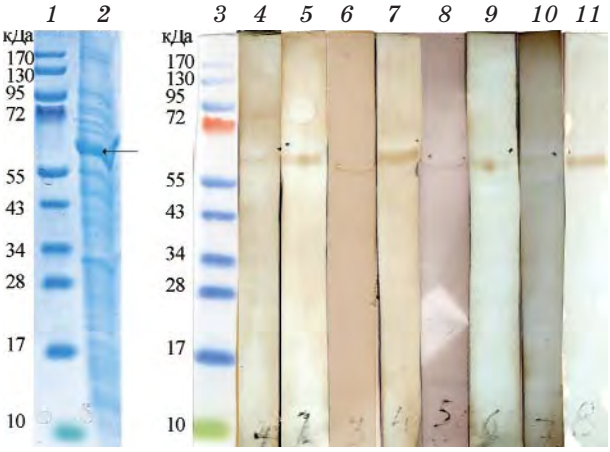

Рис. 2. **Імуноблот-аналіз розпізнавання субодиниці B, клонованої у векторі p*GEX-4T-1*, scFv-антитілами різних клонів:**
1, 3 — маркери; *2* — електрофореграма лізату клону-продуцента субодиниці B (смугу, що за масою відповідає субодиниці B позначено стрілкою); *4–11* — імуноблот-аналіз з використанням відповідно антитіл scFv14, scFv30, scFv42, scFv51, scFv56, scFv61, scFv94, scFv120

Для підвищення виходу цільового протеїну гени scFv-антитіл, відібраних з імунної бібліотеки, раніше були субклоновані в експресійному векторі p*ET-22b*. У цій роботі послідовність scFv II-15 також було субклоновано у p*ET-22b* та отримано продуцент на основі штаму *E. coli* Rosetta.

Експресія рекомбінантних антитіл у векторах під контролем сильного промотору, як правило, призводить до отримання антитіл в нерозчинній формі у бактеріальних тільцях включення. У нормі кожен варіабельний домен містить консервативний дисульфідний зв'язок. За відновлювальних умов цитоплазми *E. coli* такі дисульфідні зв'язки не можуть формуватись [28]. Утворення стабільних S-S-містків у *E. coli* відбувається в периплазматичному просторі (специфічному компартменті, розташованому між внутрішньою та зовнішньою бактеріальними мембранами), де комплекс Dsb-ензимів забезпечує окиснення та ізомеризацію дисульфідних містків [29], тому вже в перших роботах із клонування антитіл [30] до послідовності варіабельних фрагментів було приєднано сигнал транспортування до периплазматичного простору, що підвищує ймовірність отримання принаймні частково активного протеїну. Для підвищення частки функціонально активних фрагментів антитіл також використовують штами *E. coli*, мутантні за генами *trxB* та *gor*, у цитоплазмі яких порушено системи кепінгу тіолових груп, що сприяє коректному формуванню

дисульфідних зв'язків [31, 32], а також застосовують коекспресію чи гібридизацію з шаперонами чи шапероноподібними протеїнами [31–33]. Однак усі ці підходи дозволяють лише підвищити частку функціонально активних рекомбінантних антитіл і не є універсальними. З іншого боку, фрагменти антитіл можуть бути переведені у функціонально активну форму вже після виділення з бактеріальних клітин шляхом рефолдингу *in vitro*. За наявності в послідовності рекомбінантного протеїну гістидинового тага можна застосовувати один з ефективних методів рефолдингу — рефолдинг «на колонці» зі ступінчастим чи градієнтним зменшенням концентрації денатуранта [34]. Це можливо завдяки тому, що протеїни з гіс-тагом здатні афінно зв'язуватись із сорбентом навіть коли вони розчинені у сильному денатуранті (наприклад, 8 М сечовині) під час проведення афінної хроматографії з іммобілізованими іонами металів (IMAC — immobilized metal-ion-affinity chromatography). Перевагою такого підходу є можливість поєднати процедуру виділення та рефолдингу. Виходячи з вищезазначеного, ми субклонували послідовності scFv у векторі p*ET-22b*, що містить сигнал транспортування рекомбінантного протеїну до периплазми та кодує гістидиновий таг.

Аналіз методом імуноблотингу (рис. 3) показав, що клони scFv — scFv14, scFv30, scFv42, scFv51, scFv62 і scFv120 — експресуються переважно в нерозчинній формі, а scFv94 та scFv II-15 частково синтезуються у розчинній формі й, отже, за необхідності їх можна виділяти без процедури рефолдингу з розчинної фракції бактеріальних протеїнів. Імуноблотинг також виявив присутність незначної частини продукту в середовищі інкубування (рис. 4), що, ймовірно, пояснюється поступовим лізисом відмерлих клітин. Культуральне середовище є малопридатним для виділення scFv. Таким чином, для проаналізованих у роботі клонів scFv найбільший вміст продукту виявлено в нерозчинній фракції бактеріальних протеїнів, а scFv II-15 та scFv94 також частково синтезуються у розчинній формі.

У процесі відбору scFv ми спочатку використали неімунну бібліотеку, отриману в Пущинському філіалі Інституту біоорганічної хімії ім. М. М. Шемякіна і Ю. А. Овчинникова Російської академії наук [19]. Пізніше сконструювали імунну до дифтерійного токсину бібліотеку та провели селекцію scFv з неї [20]. Порівнюючи ці два підходи, можна відзначити, що з наївної бібліотеки вдалося відібрати лише один клон, специфічний до дифтерійного токсину, натомість із імунної — близько трьох десятків клонів. Константа афінності до субодиниці В у scFv, виділених з імунної бібліотеки, у середньому була вища. Так, якщо константа афінності scFv з наївної бібліотеки становила $1{,}2 \cdot 10^7$ M^{-1}, то з імунної бібліотеки — у середньому 10^8 M^{-1}, а для одного з клонів — 10^9 M^{-1}. Імовірно, це пояснюється попередньою імунізацією тварин-донорів, унаслідок чого підвищується вірогідність відбору антитіл, гени яких було ампліфіковано з В-лімфоцитів, що пройшли афінне дозрівання. Тому, виходячи з нашої мети — відібрати ряд scFv, що могли б використовуватись у діагностиці

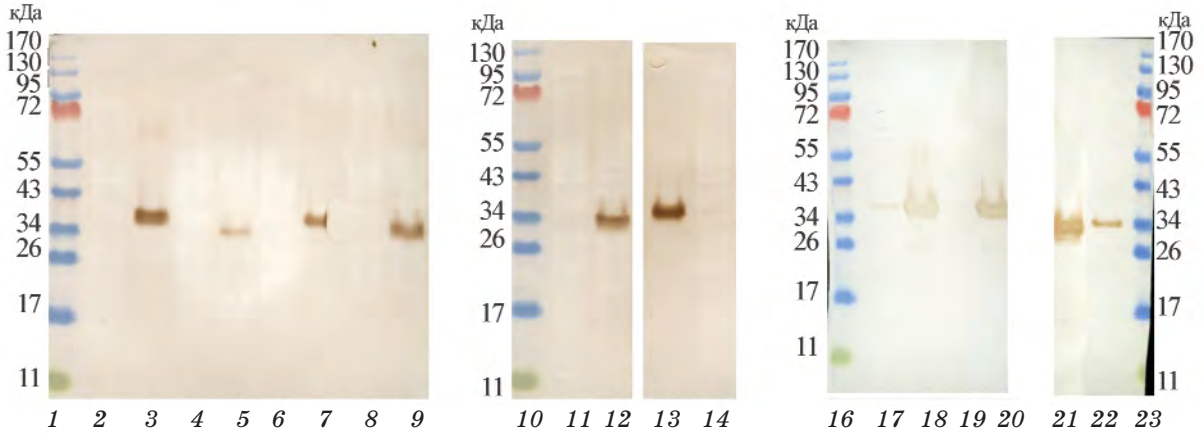

Рис. 3. **Імуноблот-аналіз наявності scFv у розчинній та нерозчинній протеїнових фракціях продуцента:** *1, 10, 16, 23* — маркери; *2, 4, 6, 8, 11, 14, 17, 19, 22* — розчинні фракції продуцентів відповідно антитіл scFv14, scFv30, scFv42, scFv51, scFv56, scFv61, scFv94, scFv120 та scFv II-15; *3, 5, 7, 9, 12, 13, 18, 20, 21* — нерозчинні фракції продуцентів відповідно антитіл scFv14, scFv30, scFv42, scFv51, scFv56, scFv61, scFv94, scFv120 та scFv II-15

та терапії дифтерії, більш ефективною була робота з імунною бібліотекою. Деякі дослідники вважають [35, 36], що на практиці підхід, заснований на конструюванні та селекції імунних бібліотек, є результативнішим, адже в цьому разі ймовірність відбору специфічних антитіл до цільового антигену значно зростає, що дає змогу виділити велику кількість клонів, серед яких простіше відібрати ті, що мають бажані властивості. Разом з тим безумовною перевагою наївних бібліотек є їхня універсальність та можливість відбору антитіл фактично до будь-якого антигену [37], що підтверджує й наша робота, в якій із наївної мишачої бібліотеки вдалось виділити scFv, специфічне до дифтерійного токсину [19].

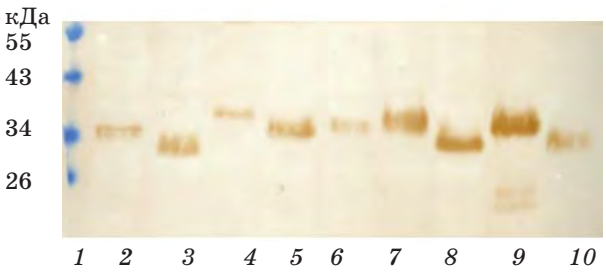

Рис. 4. **Імуноблот-аналіз наявності scFv-антитіл у культуральному середовищі інкубування продуцентів:**
1 — маркери; *2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10* — відповідно scFv14, scFv30, scFv42, scFv51, scFv56, scFv61, scFv94, scFv120 та scFv II-15

У результаті проведеної роботи було підтверджено, що після одного раунду селекції з імунної бібліотеки було відібрано вісім гетерогенних клонів-продуцентів scFv-антитіл, специфічних саме до послідовності фрагмента В дифтерійного токсину. Аналіз клонів, отриманих після субклонування ДНК-послідовностей scFv у векторі p*ET-22b*, показав, що цільовий протеїн переважно експресується в нерозчинній формі, проте scFv II-15 та scFv94 частково синтезуються розчинними. Одержані результати свідчать про перспективність подальшої роботи з отриманими scFv-антитілами для розроблення діагностичних і терапевтичних протидифтерійних препаратів нового покоління.

Цю роботу було виконано за часткової підтримки Гранту Президента України для обдарованої молоді в рамках реалізації проекту «Отримання токсиннейтралізуючих рекомбінантних одноланцюгових варіабельних фрагментів антитіл проти дифтерійного токсину» згідно з Розпорядженням Президента України від 17.11.2008 № 319/2008-рп.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Mokrousov I.* Corynebacterium diphtheriae: Genome diversity, population structure and genotyping perspectives // Infect. Genet.E volut. — 2009. — V. 9, N1. — P. 1–15.
2. *Eskola J., Lumio J. Vuopio-Varkila J.* Resurgent diphtheria — are we safe? // Brit. Med. Bul. — 1998. — V. 54, N3. — P. 635–645.
3. *Eilers M.* Queen Victoria's descendants. — Baltimore: Genealogical publishing Co, 1987. — 245 p.
4. *Weisberg Sh.* Diphtheria // Disease-a-Month. — 2007. — V. 53, N9. — P. 430 — 434.
5. *Vitek Ch., Wharton M.* Diphtheria in the former Soviet Union: reemergence of a pandemic disease // Emerg. Infect. Dis. — 1998. — V. 4, N4. — P. 539–550.
6. *Galazka A.* The changing epidemiology of diphtheria in the vaccine era // J. Infect. Dis. — 2000. — V. 181, N1. — P. 2–9.
7. *Mattos-Guaraldi A. L., Moreira L. O., Damasco P. V. et al.* Diphtheria Remains a Threat to Health in the Developing World — An Overview // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. — 2003. — V. 98, N8. — P. 987–993.
8. *Ленгелер Й., Древс Г., Шлегель Г.* Современная микробиология: прокариоты. — М.: Мир, 2005. — 656 с.
9. *Filpula D.* Antibody engineering and modification technologies // Biomol. Engin. — 2007. — V. 24, N2. — P. 201–215.
10. *Vaughan T. J., Williams A. J., Pritchard K. et al.* Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library // Nat. Biotechnol. — 1996. — V. 14, N3. — P. 309–314.
11. *Schofield D. J., Pope A. R., Clementel V. et al.* Application of phage display to high throughput antibody generation and characterization // Genome Biol. — 2007. — V. 8, N11. — P. 254.
12. *Little M., Welschof M., Braunagel M. et al.* Generation of a large complex antibody library from multiple donors // J. Immun. Methods. — 1999. — V. 231, N1–2. — P. 3–9.

13. *Imai S., Mukai Y., Nagano K. et al.* Quality Enhancement of the Non-immune Phage scFv Library to Isolate Effective Antibodies // Biol. Pharm. Bull. — 2006. — V. 29, N7. — P. 1325–1330.
14. *Qin W., Zhao A., Han Y. et al.* A novel technique for efficient construction of large scFv libraries // Mol. Biotechnol. — 2007. — V. 37, N3. — P. 201–205.
15. *Laffly E., Sodoyer R.* Monoclonal and recombinant antibodies, 30 years after. . . // Human Antibodies. — 2005. — V. 14. — P. 33–55.
16. *Hoogenboom H. R.* Selecting and screening recombinant antibody libraries // Nat. Biotechnology. — 2005. — V. 23, N9. — P. 1105–1116.
17. *Tout N. L., Yau K. Y., Trevors J. T. et al.* Synthesis of Ligand-Specific Phage-Display ScFv against the Herbicide Picloram by Direct Cloning from Hyperimmunized Mouse // J. Agric. Food Chem. — 2001. — V. 49, N8. — P. 3628–3637.
18. *Chen Y.-H., Lipes B. D., Kenan D. J. et al.* Identification of recombinant antibodies against multiple distinct toll-like receptors by homolog mining a single immune scFv phage library // J. Immun. Meth. — 2009. — V. 340, N2. — P. 144 — 153.
19. *Олейник Е. С., Кабернюк А. А., Буркалева Д. А. и др.* Получение рекомбинантных scFv-антител против дифтерийного токсина методом фагового дисплея // Укр. біохім. журн. — 2007. — Т. 79, № 5. — С. 50–56.
20. *Олійник О. С., Кабернюк А. А., Редчук Т. А. та ін.* Створення імунної бібліотеки імуноглобулінових генів миші та відбір одноланцюгових Fv-антитіл, специфічних до В субодиниці дифтерійного токсину // Там само. — 2009. — Т. 81, № 2. — С. 60–71.
21. *Sambrook J., Fritsch E. F.* Molecular cloning: A laboratory Manual, Second edition. — NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. — 999 p.
22. *Кабернюк А. А., Олійник О. С., Редчук Т. А. та ін.* Клонування генів рекомбінантних субодиниць дифтерійного токсину *Corynebacterium diphtheriae* та їх експресія в клітинах *Escherichia coli* // Доп. НАН України. — 2008. — №3. — С. 160–166.
23. *Schagger H., von Jagow G.* Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa // Anal. Biochem. — 1987. — V. 166, N2. — P. 368–379.
24. *McCafferty J., Griffiths A. D., Winter G. et al.* Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains // Nature. — 1990. — V. 348, N6301. — P. 552–554.
25. *Marks J. D., Hoogenboom H. R., Griffiths A. D. et al.*. Molecular evolution of proteins on filamentous phage. Mimicking the strategy of the immune system // J. Biol. Chem. — 1992. — V. 267, N23. — P. 16007–116010.
26. *Robert R., Jacobin-Vala M.-J., Daret D. et al.* Identification of human scFvs targeting atherosclerotic lesions: selection by single round in vivo phage display // Ibid. — 2006. — V. 281, N52. — P. 40135–40143.
27. *Pansri P., Jaruseranee N., Rangnoi K. et al.* A compact phage display human scFv library for selection of antibodies to a wide variety of antigens // BMC Biotechnol. — 2009. — V. 9. — P. 6.
28. *Worn A., Pluckthun A.* Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments // J. Mol. Biol. — 2001. — V. 305, N5. — P. 989–1010.
29. *Messens J., Collet J.-F.* Pathways of disulfide bond formation in *Escherichia coli* // Int. J. Biochem. Cel. Biol. — 2006. — V. 38, N7. — P. 1050–1062.
30. *Skerra A., Pluckthun A.* Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli* // Science. — 1988. — V. 240, N4855. — P. 1038–1041.
31. *Heo M. A., Kim S. Y. J., Chung J. et al.* Functional expression of single-chain variable fragment antibody against c-Met in the cytoplasm of Escherichia coli // Prot. Expr. Pur. — 2006. — V. 47, N1. — P. 203–209.
32. *Jurado P., Ritz D., Beckwith J. et al.* Production of functional single-chain Fv antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli* // J. Mol. Biol. — 2002. — V. 320, N1. — P. 1–10.
33. *Hu X., O'Hara L., White S. et al.* Optimisation of production of a domoic acid-binding scFv antibody fragment in *Escherichia coli* using molecular chaperones and functional immobilisation on a mesoporous silicate support // Prot. Exp. Pur. — 2007. — V. 52, N1. — P. 194–201.
34. *Gu Zh. Weidenhaupt M., Ivanova N. et al.* Chromatographic Methods for the Isolation of, and Refolding of Proteins from, *Escherichia coli* Inclusion Bodies // Ibid. — 2002. — V. 25, N1. — P 174–179.
35. *Claytona R., Cookeb I. D., Partridgea L. J., Moore H.* A Combinatorial Phage Display Library for the Generation of Specific Fab Fragments Recognizing Human Spermatozoa and Inhibiting Fertilizing Capacity In Vitro // Biol. Reprod. — 1998. — V. 59, N5. — P. 1180–1186.
36. *Boldickea Th., Tesarb M., Grieselc C. et al.* Anti-VEGFR-2 scFvs for Cell Isolation. Single-Chain Antibodies Recognizing the Human Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 (VEGFR-2/flk-1) on the Surface of Primary Endothelial Cells and Preselected CD34+ Cells from Cord Blood // Stem Cells. — 2001. — V. 19, N1. — P. 24–36.
37. *Hoogenboom H. R., de Bruine A. P., Hufton S. E. et al.* Antibody phage display technology and its applications // Immunotechnology. — 1998. — V. 4, N1. — P. 1–20.

ХАРАКТЕРИСТИКА scFv-АНТИТЕЛ ПРОТИВ ДИФТЕРИЙНОГО ТОКСИНА, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ИММУННОЙ И НЕИММУННОЙ БИБЛИОТЕК ИММУНОГЛОБУЛИНОВЫХ ГЕНОВ

Е. С. Олейник
Д. В. Колибо
С. В. Комисаренко

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев

E-mail: lenaoliinyk@mail.ru

Дифтерийный токсин играет ведущую роль в развитии дифтерийной инфекции, поэтому антитела против токсина активно используются при диагностике и лечении дифтерии. Нами ранее из наивной и иммунной библиотек иммуноглобулиновых генов мыши был отобран ряд scFv-антител против субъединицы В дифтерийного токсина. Целью данной работы было охарактеризовать ряд важных свойств полученных scFv.

Рестриктным анализом подтверждено, что scFv-антитела, отобранные после одного раунда селекции из иммунной библиотеки, отличаются друг от друга, то есть все отобранные последовательности уникальны. Установлено, что scFv-антитела, выделенные из иммунной библиотеки, являются специфичными именно к последовательности фрагмента В дифтерийного токсина. Вестерн-блот-анализ клонов, полученных после субклонирования ДНК-последовательностей scFv в векторе p*ET-22b*, показал, что целевой протеин экспрессируется преимущественно в нерастворимой форме. Полученные результаты подтвердили, что был отобран ряд клонов-продуцентов гетерогенных scFv, специфичных к последовательности дифтерийного токсина, которые в дальнейшем могут быть использованы для разработки диагностических и терапевтических противодифтерийных препаратов нового поколения.

Ключевые слова: scFv-антитела, дифтерийный токсин, наивные и иммунные библиотеки иммуноглобулиновых генов.

CHARACTERIZATION OF scFv-ANTIBODIES AGAINST DIPHTHERIA TOXIN, ISOLATED FROM IMMUNE AND NAIVE IMMUNOGLOBULIN GENE LIBRARIES

O. S. Oliinyk
D. V. Kolibo
S. V. Komisarenko

Palladin Institute of Biochemistry
of the National Academy of Sciences
of Ukraine, Kyiv

E-mail: lenaoliinyk@mail.ru

The diphtheria toxin plays the leading role in the development of diphtheria infection that's why antibodies against toxin are extensively used in the diagnostics and therapeutics of diphtheria. We have previously selected a number of scFv-antibodies against diphtheria toxin B subunit from immune and na?ve immunoglobulin library. The aim of this work was to characterize some important properties of obtained scFv-antibodies.

It was confirmed by restriction endonuclease cleavage analysis that the scFv-antibodies selected from immune library after single round of selection were diverse and all selected sequences were unique. The scFv-antibodies selected from immune library were specific exactly to sequence of diphtheria toxin B fragment. Data obtained by Western blot analysis of clones derived after subcloning of scFv's DNA-sequences into p*ET-22b* vector confirmed that target protein expressed mainly in insoluble fraction. These results confirmed that we selected a number of clones-producers of heterogeneous scFv-antibodies specific to sequence of diphtheria toxin. This scFv could be used for anti-diphtheria diagnostic and therapeutic drugs of the new generation.

Key words: scFv-antibodies, diphtheria toxin, naive and immune immunoglobulin, genes libraries.