



ОЛІЙНИК

Олена Сергіївна –
кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник
Інституту біохімії
ім. О.В. Палладіна
НАН України,
lenaoliinyk@mail.ru

УДК 571.27:616-097

РЕКОМБІНАНТНІ АНТИТІЛА ДЛЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНИХ І ПРИКЛАДНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

За матеріалами наукового повідомлення
на засіданні Президії НАН України
7 травня 2014 року

Технологія рекомбінантних антитіл є потужним підходом для отримання нових діагностичних та терапевтичних реагентів. Рекомбінантні антитіла можна застосовувати для створення систем доставки лікарських засобів, імунотоксинів, як інтрабоді. Вони також можуть бути об'єднані на рівні ДНК із різноманітними маркерними молекулами, такими як флуоресцентні білки чи ферменти, для одностадійної імунодетекції антигенів. У повідомленні розглянуто основні властивості рекомбінантних антитіл та сучасні розробки щодо їх практичного використання.

Ключові слова: рекомбінантні антитіла, scFv, імуноліпосоми, імунотоксини, інтрабоді.

Вступ

Перші роботи з отримання рекомбінантних антитіл з'явилися наприкінці 80-х років. Так, автори [1] коекспресували в *Escherichia coli* VH- та VL-домени антитіл, які, потрапляючи до периплазматичного простору бактерій, асоціювали з утворенням варіабельного фрагмента. Такі молекули мали антигензв'язувальні властивості, але були нестабільними. Цю проблему вдалося подолати завдяки ковалентному об'єднанню VH- та VL-доменів. При цьому позитивний ефект спостерігався як при хімічній кон'югації, так і при об'єднанні V-доменів у єдиний білок на рівні ДНК [2]. У 1988–1989 рр. було опубліковано кілька статей, присвячених отриманню злитих варіабельних фрагментів, у яких VH- та VL-домени об'єднуються пептидним лінкером. Такі молекули дістали назву «одноланцюгові варіабельні фрагменти», або scFv (single chain variable fragment). Ці Fv-фрагменти було одержано на основі послідовностей моноклональних антитіл з відомою специфічністю. Проте вже в 1990 р. було сконструйовано бібліотеку імуноглобулінових

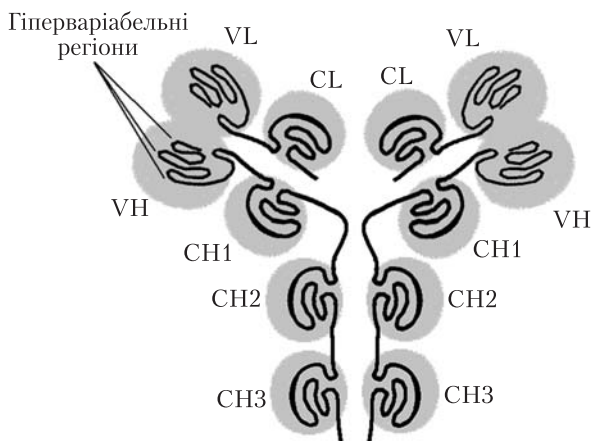


Рис. 1. Просторова будова молекули антитіла

генів вакцинованих людей, з якої шляхом тотального відбору виділили ряд scFv до правцевого токсину [3]. Однак справжній прорив технології стався зі створенням підходу для спрямованого відбору рекомбінантних антитіл з необхідною специфічністю. Для цього було адаптовано методуку представлення білкових молекул на поверхні нитчастих фагів — фаговий дисплей [4]. І вже в 1991 р., використовуючи метод фагового дисплея, з бібліотеки неімунізованих людей вдалося виділити рекомбінантні антитіла до низки цільових антигенів [5]. З цього моменту стало можливим отримувати бібліотеки рекомбінантних антитіл імунізованих чи неімунних донорів і відбирати з них клони, специфічні до будь-якого бажаного антигену, що стимулювало стрімкий розвиток технології. Було сконструйовано бібліотеки рекомбінантних антитіл не лише людини та лабораторних мишей, а й багатьох інших видів. Крім scFv- та Fab-фрагментів з'явилися різноманітні форми рекомбінантних антитіл: мультимерні та біспецифічні конструкції, однодомні антитіла, різні комбінації варіабельного фрагмента з константними доменами тощо.

Сьогодні технологія рекомбінантних антитіл стала фундаментом для розроблення терапевтичних препаратів на основі антитіл. Невеликі розміри, моновалентність та можливість злиття на рівні ДНК з різноманітними функціональними білками зробили рекомбінантні ан-

титіла потужним інструментом для фундаментальних досліджень. Крім того, нині активно розробляють підходи для використання рекомбінантних антитіл для діагностики й афінного очищення цільових антигенів, і, ймовірно, незабаром у цих напрямках відбудеться перехід від теоретичних напрацювань до практичного використання.

Природні імуноглобуліни — основа для створення рекомбінантних антигензв'язувальних молекул

Основну структурну одиницю антитіл будь-якого класу утворюють чотири поліпептидні ланцюги: два однакові легкі (L-ланцюги) та два однакові важкі (H-ланцюги). Легких ланцюгів є два типи — λ і κ , а важкі ланцюги є класоспецифічними і у людини їх, відповідно, п'ять типів. Кожний L-ланцюг містить по два домени, кожний H-ланцюг — чотири або п'ять, залежно від класу антитіла (рис. 1). На амінокінці важкого та легкого ланцюгів розташовані варіабельні домени, що є унікальними для кожного антитіла. Разом вони формують варіабельний фрагмент, який відповідає за зв'язування з антигеном. Крім того, в межах кожного з варіабельних доменів можна виділити три гіперваріабельні регіони, що безпосередньо взаємодіють з антигеном. Вони розділені чотирма каркасними ділянками, які забезпечують правильну конформацію доменів. Константні домени є однаковими для певного типу (чи підтипу) ланцюга, вони відповідають за так звані ефекторні функції, зокрема зв'язування з рецепторами лейкоцитів, комплексом, проникнення крізь плацентарний бар'єр тощо, але не беруть участі у зв'язуванні з антигеном.

Отже, хоча в організмі утворюється величезне різноманіття антитіл, власне гетерогенними і унікальними є саме варіабельні домени. Більш того, константні та варіабельні ділянки імуноглобулінів кодуються окремими генними елементами, розташованими в різних ділянках хромосоми: константні домени — обмеженою кількістю C-сегментів, варіабельні домени —

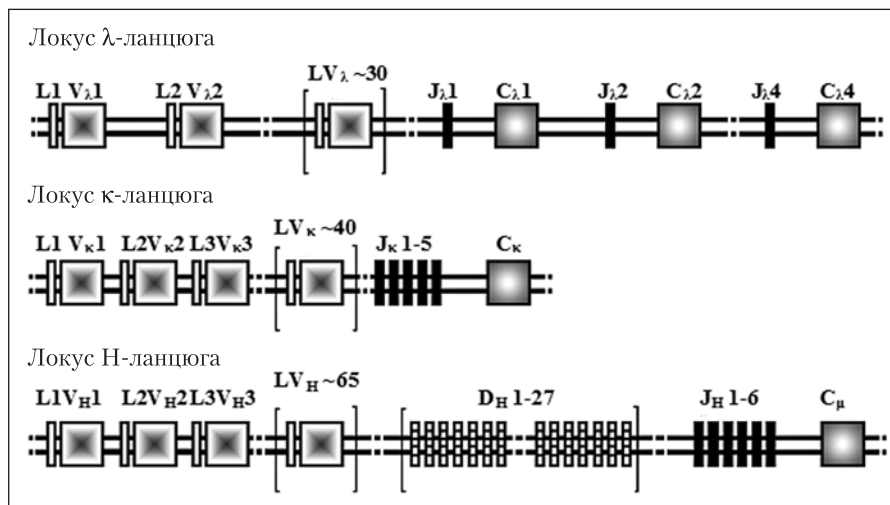


Рис. 2. Система генних сегментів, що кодує імуноглобулінові ланцюги

численними V-, J-, а у випадку важких ланцюгів ще й D-сегментами (рис. 2).

Локус людських імуноглобулінових V-генів важкого ланцюга містить 123 сегменти, що належать до семи різних родин (груп), але 79 серед них є псевдогенами. 44 VH-сегменти мають відкриту рамку зчитування, 39 з них експресуються у складі важких ланцюгів, для одного знайдено мРНК, і ще 4 не виявлено серед кДНК імуноглобулінів. Кількість J-сегментів становить 9, але функціональними серед них є лише 6. D-сегменти об'єднані у 7 субгруп, загальна кількість функціональних серед них — 25. Крім того, D-сегменти можуть кодувати амінокислотну послідовність в усіх трьох рамках зчитування.

Локус κ-генів людини складається з 76 V-сегментів, які належать до 7 субгруп, 5 J-сегментів та одного C-гена. Якщо в гаплотипі наявні два кластери κ-генів, загальна кількість сегментів становить 82 (110 з урахуванням розташованих поза основним локусом), з яких від 37 до 41 є функціональними. Якщо є лише кластер, що примикає до C-гена, то загальна кількість — 46 (74), з яких 23—25 є функціональними.

Локус λ-ланцюгів людини розташований у 22-й хромосомі. Він містить від 70 до 71 V-сегмента, а також спарені J- та C-сегменти, яких залежно від гаплотипу може бути від

7 до 11. Сегменти поділяють на 11 субгруп, крім того, 14 псевдогенів відносять до 3 кланів. Потенціальний репертуар для Vλ-сегментів залежно від гаплотипу становить від 29 до 32 функціональних генів, що належать до 10 субгруп. Кількість функціональних J- та C-сегментів залежно від гаплотипу — від 4 до 5 [6].

У процесі дозрівання клітин-продуцентів антитіл — В-клітин відбувається рекомбінація між одним з V-, (D-) та J-сегментів, унаслідок якої і формується ДНК-послідовність, що кодуватиме варіабельний домен. При цьому V-сегменти кодує перші три каркасні ділянки, перший та другий гіперваріабельний регіони, а також амінокінцеву ділянку третього гіперваріабельного регіону. J-сегменти кодує карбоксикінцеву ділянку третього гіперваріабельного регіону та всю послідовність четвертої каркасної ділянки. У випадку варіабельних доменів важких ланцюгів крім цього D-сегмент кодує центральну частину третього гіперваріабельного регіону.

Додатковим джерелом різноманіття варіабельних доменів є соматичні гіпермутації, які спостерігаються особливо часто в окремих визначених ділянках варіабельних доменів уже після того, як відбулася рекомбінація. Провідну роль у цьому процесі відіграє специфіч-

ний для В-клітин фермент — деаміназа AID (activation-induced cytidine deaminase), що «запускається» при активації В-клітин і деамінує цитозин до урацилу. AID переважно атакує WRC-мотиви (W — аденін чи тимін, R — пурин). Інший важливий фермент — урацил-N-глікозилаза може модифікувати урацил. Після цього утворена сполука стає некомплементарною азотистій основі в іншому ланцюзі. Запускаються специфічні процеси репарації за участю низькоточних (low fidelity) полімераз. При цьому внаслідок цих процесів можуть відбутися різні варіанти заміни. Вважається, що соматичні гіпермутації більш-менш рівномірно проходять в обох ланцюгах [7].

Рекомбінантні антитіла та їх різновиди

Молекула імуноглобуліну є досить великою і має складну будову. Разом з тим, антигензв'язувальні властивості притаманні лише варіабельному фрагменту антитіла, що й використовують для отримання рекомбінантних форм. Рекомбінантні варіабельні фрагменти можна одержати в різних системах експресії, зокрема в клітинах бактерій, вони є менш імуногенними, їх можна легко об'єднати на рівні ДНК з різними функціонально активними білками. На сьогодні отримано найрізноманітніші варіанти рекомбінантних фрагментів антитіла і пропонуються все нові, тому надалі розглянемо лише їх основні, базові різновиди.

ScFv-антитіла містять варіабельні домени важкого й легкого імуноглобулінових ланцюгів, що об'єднані гнучким лінкером. Найчастіше використовують лінкерний пептид з послідовністю $(Gly_4Ser)_3$. Довжина та амінокислотний склад лінкера впливають на функціональні особливості scFv. Так, автори [8] використали цілу бібліотеку лінкерних пептидів, які містили гліцин, серин, треонін та аланін у довільних комбінаціях, і виявили, що послідовність лінкера впливала на розчинність scFv при експресії в клітинах *E. coli*. В іншій роботі залежно від складу лінкера варіювала активність каталітичних scFv із властивостями

ми мутази [9]. Довжина лінкера впливає на формування моно- чи мультимерних форм scFv: якщо лінкер містить принаймні 12 амінокислотних залишків, утворюються мономери, якщо довжина лінкера від 3 до 12 залишків, то можуть утворитися димерні scFv (diabody, ~60 кДа), якщо ж довжина лінкера менша від 3 залишків, можуть утворюватися тримерні (triabodies, ~90 кДа) чи тетрамерні (~120 кДа) форми [10].

Вплинути на стабільність та функціональну активність scFv можна також заміною каркасних ділянок, що, як правило, безпосередньо не беруть участі у зв'язуванні антигену, але впливають на фолдинг молекули. Наприклад, автори [11], отримавши scFv до флюоресцеїну, які синтезувалися нерозчинними та нестабільними за 37 °С, замінили в них каркасні ділянки, використавши послідовності з інших, стійкіших scFv. У результаті було отримано термодинамічно стабільні та розчинні при експресії в бактеріях scFv-антитіла. «Прищеплюючи» каркасні ділянки з scFv людини, можна гуманізувати варіабельні фрагменти миші чи інших тварин [12]. Якщо ж модифікувати scFv шляхом введення випадкових замін у послідовність CDR, можна отримати та відібрати нові, більш афінні до антигену, варіанти [13].

Рекомбінантні Fab-фрагменти складаються з двох поліпептидних ланцюгів: VH-CH1 та VL-CL, що утримуються разом завдяки дисульфідним зв'язкам між С-доменами. Як і scFv, Fab-фрагменти є популярним форматом рекомбінантних антитіла. Отримано велику кількість бібліотек як мишачих, так і людських Fab-фрагментів і виділено високоафінні Fab до різних антигенів. Fab-фрагменти, як правило, стабільніші за scFv, але вони складаються з двох поліпептидних ланцюгів, тому зазвичай вихід активних молекул при експресії в гетерогенних системах є невисоким, крім того, можливе утворення не гетеро-, а гомодимерів. Для вирішення цих проблем було запропоновано формат одноланцюгових scFab, в яких послідовності важкого та легкого ланцюгів об'єднані в ділянці константних доменів лінкером [14].

Однодоменні рекомбінантні фрагменти антитіл. У камелід (верблюдов та лам) і хрящових риб (килимових акул та акул-няньок) антитіла мають лише важкий ланцюг. Варіабельний фрагмент антитіл камелід називається V_HH (~15 кДа), він містить чотири каркасні ділянки і три гіперваріабельні регіони. Варіабельний домен акул називається IgNAR (new antigen receptor) і містить лише два гіперваріабельні регіони (~12 кДа) [15]. Варіабельні фрагменти антитіл камелід ще називають нанободі. Завдяки низькій молекулярній масі вони мають ряд переваг. Зокрема, розробляються підходи до їх застосування для стабілізації схильних до агрегації білків, при терапії амліодозів, для кристалізації нестабільних білків [16].

Фрагменти, що містять лише один варіабельний домен, отримано і на основі V-доменів людини та миші. Такі конструкції називають dAb (domain antibody). Одержано низку dAb з антигензв'язувальною активністю, однак за своїми характеристиками вони поступаються нанободі [17].

Мультимерні конструкції рекомбінантних фрагментів антитіл. При використанні в умовах *in vivo* невеликі розміри та відсутність Fc-фрагментів є перевагами, але саме ці особливості зумовлюють швидкий кліренс scFv в організмі. Одним із підходів для підвищення часу півжиття рекомбінантних фрагментів *in vivo* є кон'югація з поліетиленгліколем (ПЕГілювання) [18]. Інший варіант — створення мультимерних конструкцій. Мультимери завдяки збільшенню кількості активних центрів мають вищу авідність, можуть включати Fv-фрагменти, специфічні до кількох різних антигенів, і внаслідок більшого розміру мають довший час півжиття в організмі. Один із підходів для отримання мультимерних форм полягає у зменшенні довжини лінкера між V_H- та V_L-доменами [19]. Мультиспецифічні (як правило, біспецифічні) форми містять одночасно антигензв'язувальний фрагмент до цільового антигену (наприклад, маркера пухлин) і послідовність, що реагує з певними молекулами імунної системи, такими як рецептори природних кілерів макрофагів чи Т-клітин [20].

Спрямована *in vitro* селекція — спосіб отримання антитіл з необхідною специфічністю

Опосередкована антитілами імунна відповідь — це унікальний механізм, створений природою. Потенційно під час зустрічі з будь-яким антигеном в організмі можуть утворитися специфічні до нього антитіла. Проте в сироватці крові завжди наявні антитіла до найрізноманітніших антигенів, а антитіла до цільового також є різно-рідними: вони специфічні до різних його ділянок і синтезуються різними клонами В-клітин, тобто є поліклональними. Технологія отримання моноклональних антитіл (антитіл, що синтезуються нащадками єдиної клітини-продуцента, гібридизованої з мієломною клітиною [21]) справила неоціненний вплив на розвиток фундаментальних і прикладних напрямів сучасної біології. Моноклональні антитіла, ідентичні за всіма характеристиками, можна отримувати в необмежених кількостях. Вони стали незамінним інструментом для виявлення та ідентифікації цільових молекул методами імуноцитохімії, як компоненти діагностикумів та основа для створення терапевтичних препаратів. Рекомбінантні антитіла, як і гібридомні, є моноклональними за своєю природою. Проте важливою відмінністю технології рекомбінантних антитіл порівняно з гібридомною є можливість спрямованого відбору позитивних клонів. У гібридомній технології ідентифікацію необхідних клонів-продуцентів здійснюють шляхом перевірки кожної з отриманих гібридом. Під час роботи з бібліотеками рекомбінантних антитіл проводять кілька раундів спрямованої селекції на цільовому антигені, внаслідок чого відсоток позитивних клонів істотно збільшується. На сьогодні, крім уже згаданого фагового дисплея, для селекції рекомбінантних антитіл широко використовують також клітинний та рибосомний дисплей. У першому випадку антитіла експонуються на поверхні клітин дріжджів чи ссавців, і при додаванні флуоресцентно міченого антигену клітини-носії позитивних клонів можна виділяти методом FACS (fluorescence-activated cell sorting). Рибосомний дисплей

ґрунтується на використанні безклітинних систем експресії. Потрійні комплекси мРНК — рибосома — антитіло афінно відбирають на цільовому антигені [22].

Можливість спрямованого відбору дозволяє виділяти позитивні клони навіть у випадку антигенів, до яких з тієї чи іншої причини складно отримати високий рівень гуморальної імунної відповіді. Крім того, спрямована селекція *in vitro* уможлиблює виділення антитіл з бібліотек неімунізованих донорів. Так, ми отримали scFv миші до дифтерійного токсину і з імунної, і з неімуної бібліотек. Вочевидь, лабораторні миші не могли природним чином проімунізуватися дифтерійним токсином, попри це, з неімуної бібліотеки шляхом селекції було виділено один специфічний клон з афінністю близько $10(8)$ М. Отже, спрямована *in vitro* селекція дає змогу виділяти з бібліотек антитіла до антигенів, з якими донор міг ніколи не контактувати. З іншого боку, з бібліотеки мишей, імунізованих рекомбінантним фрагментом токсину, вдалося виділити цілу низку клонів з афінністю до $10(9)$ М. У цьому полягає ще одна безсумнівна перевага спрямованої селекції: у разі роботи з бібліотеками попередньо імунізованих донорів найбільш афінні та специфічні клони можна відібрати швидко і без значних зусиль [23–25].

Рекомбінантні антитіла у фундаментальних дослідженнях

На сьогодні в різних лабораторіях світу отримано величезну кількість рекомбінантних антитіл. Їх рутинна характеристика, як правило, включає визначення специфічності та секвенування ДНК-послідовностей, а іноді й епітопне картування і рентгеноструктурний аналіз. Отже, накопичуються величезні масиви даних, необхідні для передбачення просторової будови та антигенної специфічності антитіл за їх амінокислотною послідовністю. Хоча при отриманні рекомбінантних антитіл це і не є безпосереднім завданням, проте накопичення такої інформації робить вагомий внесок у дослідження властивостей імуноглобулінів.

Достатньо великі бібліотеки рекомбінантних scFv особини певного виду можна також розглядати як модель репертуару антитіл, що формуються чи можуть сформуватися в процесі розвитку гуморальної відповіді. Так, ми отримали неімуїну бібліотеку scFv-антитіл людини, що містить близько мільярда різних клонів. З бібліотеки, зокрема, було виділено scFv-антитіла до нікотинового ацетилхолінового рецептора (nAChR) $\alpha 7$ -субтипу. Цей рецептор широко представлений в організмі як у нервовій системі, так і за її межами. Зміни рівня альфа7-nAChR у головному мозку спостерігаються при шизофренії, хворобах Альцгеймера та Паркінсона. Відомо, що пацієнти з різними нейродегенеративними захворюваннями можуть мати аутоантитіла до $\alpha 7$ -nAChR. Такі антитіла також містяться в сироватці крові багатьох здорових людей, але можуть бути фактором ризику на ранніх стадіях хвороби Альцгеймера [26]. Сироваткові антитіла є поліклональними, і їх досить складно досліджувати. У разі рекомбінантних антитіл для кожного клону окремо можна встановити специфічність, афінність і власне нуклеотидну та амінокислотну послідовність. Виділені нами з бібліотеки здорових молодих донорів scFv до $\alpha 7$ -nAChR, вірогідно, репрезентують пул антитіл, що детектуються в сироватці крові людей як специфічні до $\alpha 7$ -nAChR. Було визначено, що такі антитіла мають невисоку, але достатню для специфічного зв'язування афінність — близько $10(7)$ М. Що ще цікавіше, усі виділені позитивні клони містили VH3-11 генний сегмент, асоційований з деякими аутоімуїними захворюваннями. Отримані дані підтверджують, що в репертуарі антитіл здорових людей можуть бути антитіла до $\alpha 7$ -nAChR, які за певних умов здатні залучатися до аутоімуїнного процесу, що, вірогідно, спостерігається під час розвитку деяких нейродегенеративних захворювань, пов'язаних з $\alpha 7$ -nAChR.

Також з бібліотеки scFv-антитіл людини ми виділили антитіла, специфічні до антигенів збудника туберкульозу МРТ63 та МРТ83. Відібрані scFv, ймовірно, репрезентують репертуар антитіл, утворених унаслідок вакцинації живою вакциною БЦЖ. Оскільки провідну

роль у протитуберкульозній імунній відповіді відіграє клітинна ланка імунітету, тривалий час саме вона була у фокусі досліджень. Разом з тим, останнім часом з'являється дедалі більше даних про те, що опосередкована антитілами імунна відповідь також є важливою під час розвитку туберкульозної інфекції. Більше того, хоча загалом вважають, що антитіла не забезпечують захист організму від туберкульозу, в роботі [27] було продемонстровано, що антитіла до мікобактеріального антигену α -кристаліну ефективні для пасивної протитуберкульозної імунізації. Обрані нами антигени МРТ63 та МРТ83, як показано в багатьох дослідженнях, зокрема й у наших [28–30], є високоімуногенними та індукують утворення специфічних антитіл. Ці білки розглядають також як перспективні антигени для створення субодичних вакцин [31]. Нещодавно функції МРТ83 було з'ясовано [32], а функції МРТ63 залишаються невідомими. Отже, відібрані scFv-антитіла можуть виявитися дуже зручним зондом для подальшого вивчення функцій МРТ63, а також для з'ясування ролі гуморальної відповіді до МРТ63 та МРТ83 у розвитку туберкульозної інфекції.

З бібліотеки scFv-антитіл людини було також виділено антитіла до рецепторзв'язувальної субодичності дифтерійного токсину. У цьому випадку було одержано низку клонів з афінністю до 10(8) М [33]. Оскільки донори, генетичний матеріал яких використовували при створенні бібліотеки, отримували планові щеплення протидифтерійної вакцини, наявність високоафінних антитіл до дифтерійного токсину є цілком передбачуваною і загалом узгоджується з нашими попередніми дослідженнями протидифтерійного імунітету в популяції вакцинованих здорових донорів [34].

Рекомбінантні антитіла, як і гібридомні моноклональні, використовують у різних методах фундаментальних досліджень. Проте рекомбінантні технології відкривають додаткові можливості. Наприклад, невеликі за розміром та моновалентні scFv можна експресувати безпосередньо в клітинах-мішенях, спостерігаючи за відповідними ефектами на живих систе-

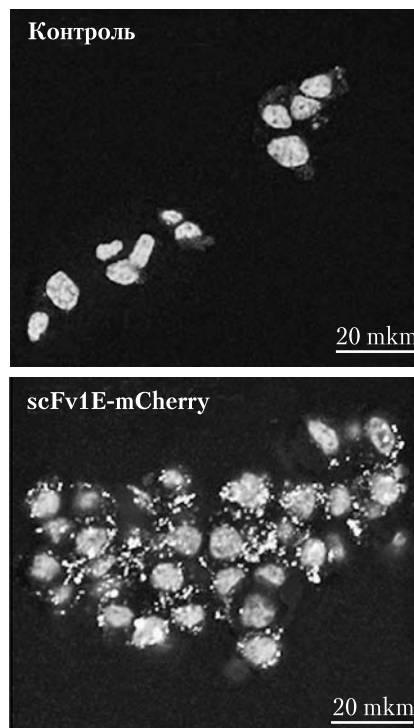


Рис. 3. Детекція $\alpha 7$ -нікотинного ацетилхолінового рецептора на поверхні клітин лінії PC12 scFv-антитілами 1E, об'єднаними з червоним флуоресцентним білком mCherry

мах. Такі антитіла дістали назву «інтрабоді» і є ефективними молекулярними зондами для дослідження динамічних процесів у живих клітинах. Також рекомбінантні антитіла можна об'єднувати з різноманітними мітками в єдиний білок на рівні ДНК, завдяки чому зникає потреба в етапі хімічної кон'югації антитіла та мітки. Наприклад, одне з отриманих нами scFv до $\alpha 7$ -nAChR було об'єднано на рівні ДНК з червоним флуоресцентним білком mCherry. Отриманий ф'южн-білок дозволяє виявляти $\alpha 7$ -nAChR на досліджуваних клітинах, як це продемонстровано на прикладі лінії PC12 (рис. 3).

Рекомбінантні антитіла для розроблення терапевтичних препаратів

Природні антитіла забезпечують захист організму, виконуючи роль своєрідних міток для елементів неспецифічного імунітету (зокре-

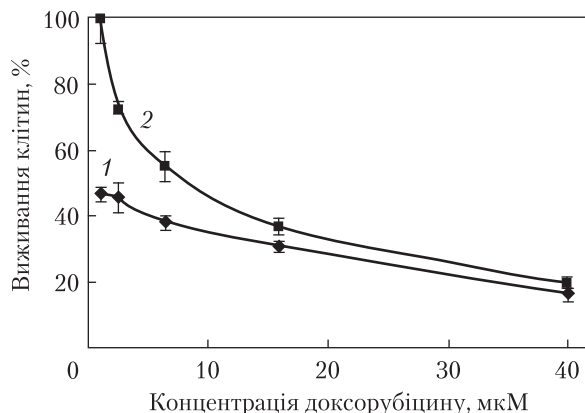


Рис. 4. Загибель клітин лінії A431 під дією навантажених доксорубіцином контрольних ліпосом та НВ-EGF-специфічних імуноліпосом: 1 — імуноліпосом; 2 — контрольні ліпосом

ма, макрофагів, нормальних кілерів, системи комплементу) або безпосередньо перешкоджаючи зв'язуванню токсинів, вірусів чи мікроорганізмів із рецепторами їх клітин-мішеней. Також можна отримати антитіла, здатні блокувати взаємодію між регуляторними молекулами. За допомогою таких антитіл стає можливим корегувати різноманітні патологічні стани, що використовують у лікуванні низки захворювань, зокрема онкологічних та аутоімунних. З того часу як було розроблено гібридомну технологію, в усьому світі отримано величезну кількість унікальних за своїми ефектами моноклональних антитіл миші, однак, оскільки такі антитіла є чужорідними для людини, це суттєво обмежувало можливості їх використання з терапевтичними цілями.

Перші терапевтичні препарати на основі антитіл з'явилися в середині 1980-х років. Це були гібридомні мишачі антитіла, в яких для зменшення імуногенності константні домени миші замінювали на людські з отриманням так званих химерних антитіл. У 1990-х роках розроблено кілька препаратів на основі гуманізованих антитіл, у яких залишаються лише мишачі гіперваріабельні регіони, а константні домени та каркасні ділянки варіабельних замінюють на людські. Зрештою, у 2002 р. на ринку з'являється перший препарат повністю люд-

ських антитіл — Humira. Це антитіла до фактора некрозу пухлин альфа, що використовують для лікування низки аутоімунних хвороб. Їх було отримано з бібліотеки рекомбінантних фрагментів антитіл людини, після чого модифіковано у повнорозмірну форму [35].

Нині кількість дозволених для використання препаратів терапевтичних антитіл наближається до 40, і щороку на ринку з'являються нові продукти. Деякі з них отримано з бібліотек рекомбінантних антитіл, деякі — це гуманізовані гібридомні, однак у будь-якому випадку такі препарати є продуктом рекомбінантних технологій. Отже, саме прогрес у технології рекомбінантних антитіл став передумовою для розвитку біотехнології терапевтичних препаратів на основі антитіл. Крім того, є низка перспективних розробок. Зокрема, одразу кілька великих корпорацій розробляють зараз технології отримання антитіл людини у трансгенних мишах. Поки що як основне завдання таких робіт розглядають отримання мишачих гібридом, що синтезуватимуть повнорозмірні моноклональні антитіла людини [36].

Рекомбінантні scFv виявилися також найзручнішим форматом антитіл для конструювання імуноліпосом. Ліпосоми є ефективними транспортувальними векторами для доставки протипухлинних агентів, які вже тривалий час використовують у терапії онкологічних захворювань. Імуноліпосоми — наступний етап розвитку технології. Вони несуть на своїй поверхні антитіла, специфічні до певної мішені на поверхні пухлинних клітин, завдяки чому імуноліпосоми краще поглинаються клітинами-мішенями, забезпечуючи ефективнішу доставку протипухлинного препарату. Оскільки scFv не мають константних доменів, але володіють антигензв'язувальними властивостями, їх широко застосовують для розроблення імуноліпосом [37].

Зокрема, ми отримали scFv до фактору НВ-EGF [38], що міститься на поверхні клітин багатьох видів пухлин, і використали для створення імуноліпосом. Як видно з рис. 4, у цитотоксичному тесті на клітинах лінії епідермоїдної карциноми A431 LD50 для НВ-EGF-специфічних імуноліпосом загибель клітин є

приблизно у 8 разів нижчою, ніж для звичайних ліпосом, також навантажених доксорубіцином. Отже, доза препарату, необхідна для знищення пухлинних клітин, зменшується, що є вкрай важливим, адже протипухлинні препарати токсичні не лише для пухлинних, а й для нормальних клітин.

Сьогодні також активно розробляють імунотоксини на основі рекомбінантних антитіл. Препарати такого типу — це антитіла, специфічні до певного маркера клітин-мішеней, об'єднані з токсичною молекулою. У випадку рекомбінантних антитіл таке об'єднання можна здійснювати безпосередньо на рівні ДНК, синтезуючи імунотоксин як єдиний білок, що містить у своєму складі і антитіло, і токсин. Це дозволяє уникнути додаткових етапів хімічної кон'югації, що здешевлює процедуру та гарантує збереження функціональних властивостей обох компонент. Зараз імунотоксини розглядають як перспективні препарати для лікування не лише онкологічних, а й аутоімунних захворювань.

Перспективи використання рекомбінантних антитіл для розроблення діагностикумів

Розроблення діагностичних тест-систем є традиційною і комерціалізованою сферою використання моноклональних гібридомних антитіл. Проте запропоновано кілька дуже перспективних розробок на основі рекомбінантних антитіл, які, можливо, з часом знайдуть використання на практиці. Зокрема, рекомбінантні антитіла можуть бути злитими на рівні ДНК із PS-тегом — полістеринзв'язувальним пептидом. Він забезпечує ефективну іммобілізацію антитіл на твердій фазі, за якої антигензв'язувальні сайти залишаються доступними, що підвищує чутливість аналізу [39].

Для спрощення детекції запропоновано також різноманітні ф'южини антитіл з мітками. Поширеним підходом є отримання scFv, злитих з бактеріальною лужною фосфатазою [40]. Такі молекули містять одночасно і фрагмент антитіла, і фермент, який каталізує реакцію, внаслідок чого візуалізуються результати аналізу і стає можливим виявлення антигену в прямому імунферментному аналізі. Рекомбінантні антитіла також можна об'єднати зі стрептавідинзв'язувальним білком, що дає змогу використовувати для детекції комерційно доступний кон'югат стрептавідину з пероксидазою [41]. Одержано й scFv, злиті зі стрептавідином. У цьому разі для детекції застосовано біотинільовану пероксидазу [42].

Уже згадувані ф'южини антитіл із флуоресцентними білками можна використовувати для прямої детекції у флуоресцентному аналізі. Варто згадати також scFv, об'єднані в різних комбінаціях із константними доменами [43], та гібриди зі стафілококовим білком А [44]. При цьому для детекції можна застосовувати комерційно доступні мічені антитіла, специфічні до Fc-фрагментів.

Перші рекомбінантні антитіла було отримано близько 35 років тому. З того часу рекомбінантні технології нерозривно вплелися у біотехнологію антитіл. З кожним роком інтерес до цього напрямку лише зростає, з'являються нові перспективні розробки, і, ймовірно, в подальшому сфері застосування рекомбінантних антитіл розширятимуться, а їх використання відкриватиме нові можливості у фундаментальній біології та біомедицині.

Доповідач висловлює щирі подяку всім співавторам робіт, на основі яких підготовлено повідомлення, особливо С.В. Комісаренку, Д.В. Колибі, А.А. Кабернюку, А.Ю. Лабинцеву.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Skerra A., Plückthun A. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli* // Science. — 1988. — V. 240, N 4855. — P. 1038–1041.
2. Glockshuber R., Malia M., Pfitzinger I., Plückthun A. A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments // Biochemistry. — 1990. — V. 29, N 6. — P. 1362–1367.
3. Mullinax R.L., Gross E.A., Amberg J.R. et al. Identification of human antibody fragment clones specific for tetanus toxoid in a bacteriophage lambda immunoexpression library // PNAS. — 1990. — V. 87, N 20. — P. 8095–8099.
4. McCafferty J., Griffiths A.D., Winter G., Chiswell D.J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains // Nature. — 1990. — V. 348, N 6301. — P. 552–554.
5. Marks J.D., Hoogenboom H.R., Bonmert T.P. et al. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage // J. Mol. Biol. — 1991. — V. 222, N 3. — P. 581–597.
6. The international immunogenetics information system [Database]. — <http://www.imgt.org>.
7. Maul R.W., Gearhart P.J. Controlling somatic hypermutation in immunoglobulin variable and switch regions // Immunol. Res. — 2010. — V. 47, N 1–3. — P. 113–122.
8. Reinl S.J., Cameron T.I., Vojdani F. et al. Individualized human scFv vaccines produced in plants: humoral anti-idiotype responses in vaccinated mice confirm relevance to the tumor Ig // J. Immunol. Meth. — 2003. — V. 278, N 1–2. — P. 95–104.
9. Tang Y., Jiang N., Parakh C., Hilvert D. Selection of Linkers for a Catalytic Single-chain Antibody Using Phage Display Technology // J. Biol. Chem. — 1996. — V. 271, N 26. — P. 15682–15686.
10. Guo J., Cai M. New type recombinant antibody fragment scFv multimer and cancer targeting // Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi. — 2003. — V. 20, N 2. — P. 361–365.
11. Jung S., Plückthun A. Improving *in vivo* folding and stability of a single-chain Fv antibody fragment by loop grafting // Protein. Eng. — 1997. — V. 10, N 8. — P. 959–966.
12. Asano R., Nakayama M., Kawaguchi H. et al. Construction and humanization of a functional bispecific EGFR × CD16 diabody using a refolding system // FEBS J. — 2012. — V. 279, N 2. — P. 223–233.
13. Steinwand M., Droste P., Frenzel A, et al. The influence of antibody fragment format on phage display based affinity maturation of IgG // MAbs. — 2014. — V. 6, N 1. — P. 204–218.
14. Hust M., Jostock Th., Menzel Ch. et al. Single chain Fab (scFab) fragment // BMC Biotechnol. — 2007. — N 7. — P. 14.
15. Kovalenko O.V., Olland A., Piché-Nicholas N.J. Atypical antigen recognition mode of a shark immunoglobulin new antigen receptor (IgNAR) variable domain characterized by humanization and structural analysis // Biol Chem. — 2013. — V. 288, N 24. — P. 17408–17419.
16. Siontorou C.G. Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy // Int. J. Nanomedicine. — 2013. — N 8. — P. 4215–4227.
17. Holt L.J., Herring Ch., Jespers L.S. et al. Domain antibodies: proteins for therapy // Trends in Biotechnology. — 2003. — V. 21, N 11. — P. 484–490.
18. Chen C., Constantinou A., Deonarain M. Modulating antibody pharmacokinetics using hydrophilic polymers // Expert Opin. Drug Deliv. — 2011. — V. 8, N 9. — P. 1221–1236.
19. Asano R., Hagiwara Y., Koyama N. et al. Multimerization of anti-(epidermal growth factor receptor) IgG fragments induces an antitumor effect: the case for humanized 528 scFv multimers // FEBS J. — 2013. — V. 280, N 19. — P. 4816–4826.
20. Vallera D.A., Zhang B., Gleason M.K. et al. Heterodimeric bispecific single-chain variable-fragment antibodies against EpCAM and CD16 induce effective antibody-dependent cellular cytotoxicity against human carcinoma cells // Cancer Biother. Radiopharm. — 2013. — V. 28, N 4. — P. 274–282.
21. Köhler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // Nature. — 1975. — V. 256, N 5517. — P. 495–497.
22. Rothe A., Hosse R.J., Power B.E. Ribosome display for improved biotherapeutic molecules // Expert Opin. Biol. Therap. — 2006. — V. 6, N 2. — P. 177–187.
23. Олійник 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. 91–97.
24. 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 // Укр. біохім. журн. — 2009. — Т. 81, № 2. — С. 68–79.

25. Олійник О.С., Колибо Д.В., Комісаренко С.В. Характеристика scFv-антитіл проти дифтерійного токсину, виділених з імунної та неімунної бібліотек імуноглобулінових генів // Біотехнологія. — 2009. — Т. 2, № 3. — С. 55–63.
26. Koval L., Lykhtus O., Kalashnyk O. et al. The presence and origin of autoantibodies against $\alpha 4$ and $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in the human blood: possible relevance to Alzheimer's pathology // J. Alzheimer's Dis. — 2011. — V. 25, N 4. — P. 747–761.
27. Williams A., Reljic R., Naylor I. et al. Passive protection with immunoglobulin A antibodies against tuberculous early infection of the lungs // Immunology. — 2004. — V. 111, N 3. — P. 328–333.
28. Редчук Т.А., Олійник О.С., Кабернюк А.А. та ін. Клонування та експресія білків *Mycobacterium bovis* МРВ63 і МРВ83 в клітинах *Escherichia coli* // Доповіді НАН України. — 2007. — № 9. — С. 161–166.
29. Редчук Т.А., Короткевич Н.В., Кабернюк А.А. та ін. Рекombінантний химерний протеїн МРВ63-МРВ83 — перспективний антиген для діагностики туберкульозу // Біотехнологія. — 2010. — Т. 3, № 5. — С. 50–56.
30. Redchuk T., Korotkevich N., Gorbatiuk O. et al. Expression of *Mycobacterium tuberculosis* proteins МРТ63 and МРТ83 as a fusion: purification, refolding and immunological characterization // J. Appl. Biomed. — 2012. — V. 10. — P. 169–176.
31. Okada M., Kita Y. Tuberculosis vaccine development: The development of novel (preclinical) DNA vaccine // Hum. Vaccine. — 2010. — V. 4. — P. 297–308.
32. Kao F.F., Mahmuda S., Pinto R. et al. The secreted lipoprotein, МРТ83, of *Mycobacterium tuberculosis* is recognized during human tuberculosis and stimulates protective immunity in mice // PLoS One. — 2012. — V. 7, N 5. — e. 34991.
33. Олійник О.С., Кабернюк А.А., Колибо Д.В., Комісаренко С.В. Одноланцюгові варіабельні фрагменти антитіл проти В-субодиниці дифтерійного токсину, одержані з фагової бібліотеки антитіл людини // Biotechnol. Acta. — 2014 — V. 7, N 1. — P. 54–59.
34. Кабернюк А.А., Олійник О.С., Редчук Т.А. та ін. Розробка імунохімічних тест-систем для контролю протидифтерійного імунітету в популяції людей // Наука та інновації. — 2008. — Т. 4, № 3. — С. 22–31.
35. Lapadula G., Marchesoni A., Armuzzi A. et al. Adalimumab in the treatment of immune-mediated diseases // Int. J. Immunopathol. Pharmacol. — 2014. — V. 27, S. 1. — P. 33–48.
36. Moran N. Mouse platforms jostle for slice of humanized antibody market // Nat. Biotechnol. — 2013. — V. 31, N 4. — P. 267–268.
37. Pranchevicius M.C., Vieira T.R. Production of recombinant immunotherapeutics for anticancer treatment: the role of bioengineering // Bioengineered. — 2013. — V. 4, N 5. — P. 305–312.
38. Олійник О.С., Кабернюк А.А., Колибо Д.В., Комісаренко С.В. Отримання та характеристика рекombінантних одноланцюгових варіабельних фрагментів антитіл (scFv) проти гепаринзв'язувального EGF-подібного фактору росту людини // Біотехнологія. — 2012. — Т. 5, № 6. — С. 47–56.
39. Kumada Y., Hamasaki K., Shiritani Y. et al. Direct immobilization of functional single-chain variable fragment antibodies (scFvs) onto a polystyrene plate by genetic fusion of a polystyrene-binding peptide (PS-tag) // Anal. Bioanal. Chem. — 2009. — V. 395, N 3. — P. 759–765.
40. Oyama H., Tanaka E., Kawanaka T. et al. Anti-idiotypic scFv-enzyme fusion proteins: a clonable analyte-mimicking probe for standardized immunoassays targeting small biomarker // Anal. Chem. — 2013. — V. 85, N 23. — P. 11553–11559.
41. Aubrey N., Devaux C., di Luccio E. et al. Recombinant scFv/streptavidin-binding peptide fusion protein for the quantitative determination of the scorpion venom neurotoxin AahI // Biol. Chem. — 2001. — V. 382, N 11. — P. 1621–1628.
42. Kipriyanov S.M., Breitling F., Little M., Dübel S. Single-chain antibody streptavidin fusions: tetrameric bifunctional scFv-complexes with biotin binding activity and enhanced affinity to antigen // Hum. Antibodies Hybridomas. — 1995. — V. 6, N 3. — P. 93–101.
43. Braren I., Greunke K., Umland O. et al. Comparative expression of different antibody formats in mammalian cells and *Pichia pastoris* // Biotechnol. Appl. Biochem. — 2007. — V. 47, N 4. — P. 205–214.
44. Олійник О.С., Кабернюк А.А., Редчук Т.А. та ін. Одержання біфункціональних молекул, специфічних до антигену та Fc-фрагментів антитіл, методом злиття scFv-антитіл із стафілококовим білком А // Біополімери і клітина. — 2009. — Т. 25, № 3. — С. 245–249.

Е.С. Олейник

Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины
ул. Леонтовича, 9, Киев, 01601, Украина

РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНТИТЕЛА ДЛЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ
И ПРИКЛАДНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Технология рекомбинантных антител является перспективным подходом для получения новых диагностических и терапевтических реагентов. Рекомбинантные антитела могут применяться для создания систем направленной доставки лекарственных препаратов, иммунотоксинов, как интрабоды. Они также могут быть объединены на уровне ДНК с разнообразными маркерными молекулами, такими как флуоресцентные белки или ферменты, для одностадийной иммунодетекции антигенов. В сообщении рассмотрены основные свойства рекомбинантных антител, а также современные разработки для их практического применения.

Ключевые слова: рекомбинантные антитела, scFv, иммунолипосомы, иммунотоксины, интрабоды.

O.S. Oliinyk

Palladin Institute of Biochemistry of National Academy of Sciences of Ukraine
9 Leontovicha St., Kyiv, 01601, Ukraine

RECOMBINANT ANTIBODIES FOR FUNDAMENTAL AND APPLIED RESEARCH

Recombinant antibody technology is a powerful approach for generation new diagnostic and therapeutic reagents. Recombinant antibodies could be applied in the construction of drug delivery systems, immunotoxins, as intrabodies. They also could be genetically fused to the different marker molecules, such as fluorescent proteins or enzymes for one-step immunodetection of antigens. This paper provides an overview of the properties and current studies on the application of recombinant antibodies.

Keywords: recombinant antibodies, scFv, immunoliposomes, immunotoxins, intrabodies.