

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
“ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ НАН БЕЛАРУСИ”

УДК 577.112.083+571.27

ДОРМЕШКИН  
ДМИТРИЙ ОЛЕГОВИЧ

**КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ, СОДЕРЖАЩИХ  
ФРАГМЕНТЫ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

по специальности 03.01.04 – биохимия

Минск, 2017

Научная работа выполнена в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси».

**Научный руководитель:**

**Усанов Сергей Александрович,**  
доктор химических наук, профессор,  
член-корреспондент Национальной  
академии наук Беларуси,  
академик-секретарь Отделения химии и  
наук о Земле НАН Беларуси

**Официальные оппоненты:**

**Литвинко Наталья Михайловна,**  
доктор химических наук, доцент,  
заместитель главного ученого секретаря  
НАН Беларуси

**Титов Леонид Петрович,** доктор  
медицинских наук, профессор,  
член-корреспондент Национальной  
академии наук Беларуси, заведующий  
лабораторией клинической и  
экспериментальной микробиологии  
РНПЦ эпидемиологии и микробиологии  
Учреждение образования «Белорусский  
государственный университет»

**Оппонирующая организация:**

Защита состоится «18» января 2018 г. в 10.00 на заседании Совета по защите диссертаций Д 01.21.01 в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии НАН Беларуси» по адресу: 2200141, г. Минск, ул. Академика Купревича, 5/2, в зале заседаний Ученого Совета, e-mail: babitskaya@iboch.bas-net.by, тел. (017) 267-85-53.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Я. Коласа НАН Беларуси.

Автореферат разослан «\_\_» декабря 2017 г.

Ученый секретарь  
совета по защите диссертаций Д 01.21.01  
кандидат химических наук



С.В. Бабицкая

## ВВЕДЕНИЕ

Уникальная особенность антител высокоспецифично взаимодействовать с соответствующими молекулярными мишенями, позволила им занять ведущее положение в терапии различных заболеваний, в особенности онкологических и аутоиммунных, а также стать незаменимым инструментом протеомных исследований и диагностических систем.

Наиболее широко используемая на сегодняшний день гибридная технология получения моноклональных антител имеет ряд недостатков, к которым можно отнести нестабильность клеточных линий продуцентов, невозможность получения антител к некоторым мишеням и ограниченность возможностей по улучшению функциональных характеристик антител. В связи с этим актуальной задачей является разработка универсальных подходов к получению рекомбинантных фрагментов антител гибридного происхождения и улучшению их характеристик методами генетической инженерии. Несмотря на наличие широкого разнообразия экспрессионных подходов и сшитых белковых комплексов, отсутствуют универсальные стратегии, которые бы позволяли одновременно визуализировать процесс экспрессии и очистки антител, а также увеличивать уровень их экспрессии.

Кроме того, существенные усилия направлены на разработку высокопроизводительных подходов к созданию аффинных реагентов без участия лабораторных животных. Одним из таких подходов является метод фагового дисплея. В процессе селекции отбор аффинных вариантов проходит *in vitro*, что позволяет контролировать такие параметры процесса как значение pH, ионной силы, наличие детергентов, время и температуру инкубации, а также осуществлять негативную селекцию. Это позволяет значительно ускорять процесс создания антиген-связывающего клона и получать антитела с заданной эпитопной специфичностью и кросс-реактивностью практически к любым мишеням без участия лабораторных животных. На сегодняшний день более 60 препаратов терапевтических антител, полученных с помощью фагового дисплея, проходят клинические испытания, однако, практически все комбинаторные библиотеки антител не являются коммерчески доступными. Это делает необходимым разработку собственного инструментария и новых подходов к получению аффинных молекул с использованием фагового дисплея и комбинаторных библиотек антител.

Настоящая работа посвящена созданию новых подходов к получению рекомбинантных антител в бактериальной системе *Escherichia coli* как с использованием гибридных линий в качестве источника генетического материала, так и *de novo* с применением техники фагового дисплея.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Связь работы с научными программами (проектами), темами.** Тема диссертационной работы соответствует приоритетному направлению научных исследований Республики Беларусь на 2016-2020 годы (постановление Совета Министров Республики Беларусь от 12.03.2015 г. № 190): 3. Биологические системы и технологии.

Диссертационное исследование выполнено в лаборатории молекулярной диагностики и биотехнологии Института биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, в рамках задания 3.2.05 «Моделирование, предсказание, синтез и тестирование молекулярных структур, важных для разработки новых иммунохимических методов анализа и создания противовирусных и антибактериальных препаратов» ГПНИ «Конвергенция» (№ гос. регистрации 20151349, 2011-2015 гг.), гранта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований X15M-002 от 04.05.2015 «Создание подходов к получению рекомбинантных антител к низкомолекулярным мишеням в бактериальной системе экспрессии» (№ гос. регистрации 20161404, 2015-2017 гг.), гранта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований X17M-013 от 18.04.2017 «Получение рекомбинантных антител с различной эпитопной специфичностью к гормону роста человека» (№ гос. регистрации 20171269, 2017-2019 гг.), задания 39 «Осуществить конструирование химерных антигенных рецепторов для иммунотерапии онкологических заболеваний» подпрограммы 1 «Инновационные биотехнологии – 2020» ГП «Наукоемкие технологии и техника» (№ гос. регистрации 20171410, 2017-2019 гг.).

**Цель и задачи исследования.** Цель диссертационной работы – создание новых подходов к получению рекомбинантных антител в *E.coli* с использованием генетического материала гибридных линий и с помощью фагового дисплея.

Для достижения поставленной цели планировалось решить следующие задачи:

1. Разработать универсальный подход к клонированию генов иммуноглобулинов мыши с неизвестной нуклеотидной последовательностью.
2. Сконструировать экспрессионные векторы для получения фрагментов антител в *E.coli*.
3. С использованием гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к кортизолу, получить и охарактеризовать соответствующие рекомбинантные Fab фрагменты.

4. Разработать систему для получения фрагментов антител в виде сшитого белкового комплекса для контроля процессов экспрессии и очистки, а также экспрессионную систему для *in vivo* биотинилирования рекомбинантных антител.

5. На основании анализа аминокислотного (АК) состава паратопов антител с известной структурой осуществить дизайн и конструирование оптимизированной по АК разнообразию комбинаторной библиотеки Fab фрагментов.

6. Получить новые рекомбинантные антитела и другие аффинные молекулы к ряду мишеней, имеющих научно-практическое значение, с использованием метода фагового дисплея *de novo*.

**Объект исследования** – рекомбинантные Fab, scFv и sdAb фрагменты антител.

**Предмет исследования** – методика получения рекомбинантных антител, свойства сшитых белковых комплексов антител, рациональный дизайн комбинаторных библиотек антител.

**Научная новизна:**

1. Разработан новый подход к амплификации генов иммуноглобулинов мыши с неизвестной последовательностью.

2. Сконструированы экспрессионные векторы для получения Fab фрагментов антител и их биотинилированных производных в *E.coli*, а также экспрессионный вектор для получения сшитых белковых комплексов рекомбинантных антител с цитохромом *b<sub>5</sub>*.

3. Впервые получен рекомбинантный Fab фрагмент антитела к кортизолу, идентичный по иммунохимическим свойствам полноразмерному моноклональному антителу гибридного происхождения. Получен биотинилированный Fab фрагмент антитела к кортизолу и определены кинетические параметры его связывания с антигеном.

4. Впервые получен рекомбинантный белок, содержащий Fab фрагмент антитела к кортизолу, сшитый с цитохромом *b<sub>5</sub>*. Показано сохранение антиген-связывающей способности, наличие характеристического спектра поглощения гемопротейна, а также двукратное увеличение уровня экспрессии сшитого белкового комплекса. Методами *in silico* установлена пространственная структура.

5. Проведен биоинформационный анализ АК состава CDR петель иммуноглобулинов с известной структурой. Создана комбинаторная библиотека Fab фрагментов антител человека с оптимизированным разнообразием в CDR регионе. Установлена возможность получения аффинных антител с использованием данной библиотеки, обладающей минимальным искусственным

разнообразием паратопа.

6. Методом фагового дисплея впервые идентифицирован пептид SGVYKVLVDWQHGGF, обладающий высоким сродством и специфичностью к CYP5A1. С использованием комбинаторной фаговой библиотеки получены однодоменные антитела к гормонам белковой природы – эритропоэтину и соматотропину человека. Впервые получены антитела, имеющие различные кинетические параметры связывания по отношению к белкам, обладающим 93% идентичностью последовательностей – CYP11B2 и CYP11B1 и имеющие перекрывающийся с аденодоксином (Adx) сайт связывания.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Создание новых векторных конструкций для получения фрагментов антител и их биотинилированных производных в *E.coli*, и методика клонирования генов антител с неизвестной нуклеотидной последовательностью.

2. Впервые полученный рекомбинантный Fab фрагмент антитела к кортизолу и его биотинилированное производное с иммунохимическими свойствами идентичными полноразмерным антителам.

3. Впервые сконструированный сшитый белковый комплекс цитохрома *b<sub>5</sub>* рекомбинантными фрагментами антител к кортизолу, позволяющий визуализировать процесс выделения и очистки антител, а также увеличивать уровень их экспрессии.

4. Сконструированная комбинаторная библиотека гуманизированных Fab фрагментов антител размером  $10^{11}$  уникальных клонов.

5. Идентифицированный методом фагового дисплея специфический пептид к CYP5A1 и однодоменные антитела к гормонам белковой природы – соматотропину и эритропоэтину. Полученные регио-специфические однодоменные антитела к CYP11B2.

**Личный вклад соискателя ученой степени.** Создание молекулярно-генетических конструкций и подходов к клонированию иммуноглобулинов гибридного происхождения, получение и характеристика рекомбинантных антител и белков слияния, конструирование и скрининг фаговых библиотек, а также подготовка научных публикаций проводились автором самостоятельно. Регистрация MALDI-TOF масс-спектров белков осуществлялась при участии н.с. Института биоорганической химии НАН Беларуси (ИБОХ) Шкель Т.С. Дизайн экспрессионного вектора для получения *in vivo* биотинилированных антител осуществлялся при участии н.с. ИБОХ Свирида А.В. CYP11B2 и CYP11B1 предоставлены к.х.н. Струшкевич Н.В. Гибридные линии 5Г-Н2 и ТПО-F8 предоставлены д.х.н. Свиридовым О.В. и к.х.н. Вашкевич И.И. Выполнение иммунохимического анализа рекомбинантных Fab фрагментов антител проводилось при участии н.с. ИБОХ Куприенко О.С. Работа выполнялась

под руководством д.х.н., чл.-корр. НАН Беларуси, профессора С.А. Усанова, которым были сформулированы цель и основные задачи исследования. При выполнении работы соискатель пользовался консультационной помощью к.х.н. Гилепа А.А. Соавторы работ, представленных в списке публикаций соискателя, участвовали в проведении отдельных экспериментов и обсуждении результатов.

**Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов.** Результаты работы представлены на международных и республиканских мероприятиях: V Международной конференции Российского химического общества имени Д. И. Менделеева (Москва, Россия, 2013), 57<sup>ой</sup> Научной конференции для молодых ученых по физике и естественным наукам «Open Readings 2014» (Вильнюс, Литва, 2014), Международной научной конференции молодых ученых, аспирантов, магистрантов, студентов «Актуальные экологические проблемы» (Минск, Республика Беларусь, 2014), VII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Новосибирск, Россия, 2015), V Международной конференции «Химия, структура и функция биомолекул» (Минск, Республика Беларусь, 2014), 58<sup>ой</sup> Научной конференции для молодых ученых по физике и естественным наукам «Open Readings 2015» (Вильнюс, Литва, 2015), Конференции молодых ученых-биохимиков с международным участием, посвященной 90-летию со дня рождения академика Ю.А. Островского (Гродно, Беларусь, 2015), 59<sup>ой</sup> Научной конференции для молодых ученых по физике и естественным наукам «Open Readings 2016» (Вильнюс, Литва, 2016), Конгрессе «FEBS Congress 2016 Molecular and Systems Biology for a Better Life» (Эфес, Турция, 2016), Международной конференции «BIOMEMBRANES 2016: Mechanisms of Aging and Age-Related Diseases» (Долгопрудный, Россия, 2016), IX Международном конгрессе «Биотехнологии: состояние и перспективы развития» (Москва, Россия, 2017), 7<sup>ом</sup> Вышеградском симпозиуме по структурной биологии (Новый град, Чехия, 2017).

**Опубликованность результатов диссертации.** Основные результаты диссертации опубликованы в 23 научных работах, среди которых 5 статей в научно-рецензируемых журналах, соответствующих пункту 18 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоения ученых званий в Республике Беларусь» общим объемом 4,4 авторских листа, 5 статей в сборнике научных трудов, 6 статей в сборниках материалов научных конференций и тезисы 7 докладов.

Практическая значимость результатов работы подтверждена актами внедрения в лекционные курсы «Молекулярная биотехнология» и «Химия биологически активных веществ» на кафедре биотехнологии и биоэкологии

факультета технологии органических веществ Белорусского государственного технологического университета.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, четырех глав, заключения, библиографического списка, приложений. Полный объем диссертации составляет 160 страниц, в том числе 58 рисунков занимают 19 страниц, 10 таблиц занимают 6 страниц. Библиографический список состоит из 285 наименований цитируемой литературы и 23 публикации соискателя на 22 страницах.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

В **главе 1** приведены литературные данные о моноклональных и рекомбинантных антителах – их структуре и свойствах, механизме образования, основных направлениях применения и современных технологиях получения. Основной акцент сделан на возможностях и доступном инструментарии генетической инженерии с целью манипулирования их структурой для решения конкретных прикладных задач. Рассмотрены основные подходы к получению антиген-связывающих доменов в препаративных количествах в бактериальной системе *E.coli*.

Анализ литературных данных свидетельствует о том, что ввиду исключительной ценности антител для терапии, диагностики и научных исследований, существует большое количество подходов и инструментов для их получения и характеристики. Однако, существует ряд проблем, которые зачастую затрудняют получение необходимых антител к некоторым мишеням. К ним относятся трудности при клонировании генов иммуноглобулинов гибридного происхождения, отсутствие простого и надёжного инструментария для визуализации процесса экспрессии и очистки рекомбинантных антител в бактериальной системе, а также их характеристики в сложных смесях и мутных растворах. Большая часть данных и молекулярно-генетических конструкций для получения антител методами фагового дисплея являются коммерчески закрытой информацией, что влечёт за собой необходимость анализа генетического разнообразия природных иммуноглобулинов и конструирования собственных библиотек антител.

Сделан вывод о том, что разработка универсальных подходов, включающих в себя как методы создания антиген-связывающих фрагментов антител с заданными свойствами, так и экспрессионные системы, позволяющие визуализировать процесс получения антител в реальном времени, позволит в перспективе получать таргентные препараты нового поколения и необходимые антитела для научных исследований и диагностики.

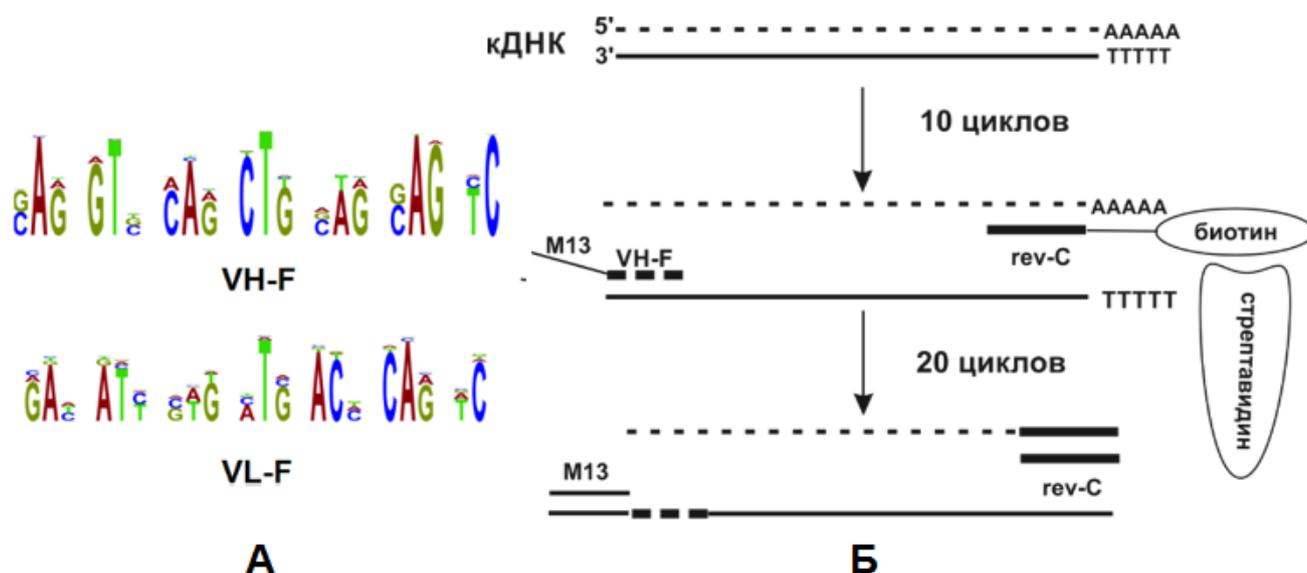
В **главе 2** представлены методики получения рекомбинантных фрагментов антител как с использованием гибридных линий, продуцирующих соответствующие антитела, так и *de novo* – с использованием комбинаторной фаговой библиотеки антител. Представлены методы физико-химической и иммунохимической характеристики антител и их фрагментов, используемые в данной работе. Часть методик является оригинальными и созданы в процессе выполнения диссертационной работы. К таким методикам относится двухстадийная схема ПЦР для клонирования генов иммуноглобулинов с неизвестной последовательностью, а также методика визуализации процесса

экспрессии и очистки фрагментов антител с использованием сшитого белкового комплекса с цитохромом *b5*. Разработанные методики и подходы являются универсальными и позволяют получать аффинные антитела с заданными свойствами практически к любым мишеням.

В главе 3 приведены основные экспериментальные результаты по получению рекомбинантных фрагментов антител и их производных с использованием генетического материала гибридных линий, а также исследования их физико-химических и иммунохимических свойств.

### Получение Fab фрагментов антител к кортизолу и тиреопероксидазе.

Для создания универсального подхода к клонированию генов иммуноглобулинов с неизвестной нуклеотидной последовательностью было проведено множественное выравнивание имеющихся в базе данных по иммуноинформатике IMGT ([www.imgt.org](http://www.imgt.org)) последовательностей иммуноглобулинов мыши. На основании анализа этой информации сконструированы универсальные праймеры (VH-F и VL-F) для амплификации генов иммуноглобулинов мыши, полностью комплементарные не менее чем 94% известных последовательностей (рисунок 1А).



А – праймеры для амплификации переменных фрагментов антител; Б – схема двухстадийной ПЦР

Рисунок 1. – Универсальный подход к клонированию генов антител

Так как данные праймеры обладают высокой степенью вырожденности, для повышения специфичности ПЦР и увеличения содержания целевого ампликона в конечной реакции, нами разработана оригинальная схема двухстадийной ПЦР (рисунок 1Б).

С применением данного подхода нами клонированы гены легкой ( $V_L C_L$ ) и фрагмента тяжелой ( $V_H C_{H1}$ ) цепи иммуноглобулинов к кортизолу и тиреопероксидазе (ТРО) с использованием генетического материала гибридных линий, продуцирующих соответствующие антитела. В качестве источника генетического материала антител к кортизолу использовали гибридную линию 5Г-Н2. Анализ их нуклеотидной последовательности позволил определить протяженность CDR участков, их канонические классы, оценить потенциальные сайты пост-трансляционных модификаций и редких АК замен. Установлено, что АК последовательность переменных фрагментов антител к кортизолу не содержит редких АК замен и сайтов модификации в CDR, а значит, может быть использована для гетерологической экспрессии рекомбинантных фрагментов антител в бактериальной системе *E.coli*.

Для этого сконструирован бицистронный экспрессионный вектор для периплазматической экспрессии Fab фрагментов антител (рисунок 2). Скрининг параметров культивирования продуцента *E.coli BL21* позволил определить условия, обеспечивающие максимальный уровень экспрессии Fab фрагментов (2,08 г/л) – 28°C, 140 об/мин, 16 ч при концентрации индуктора ИПТГ – 0,5 мМ. Использование периплазматической экспрессии в совокупности с металл-хелатной аффинной хроматографией позволило получить чистый гомогенный препарат (чистота не менее 95%) белка с ожидаемой молекулярной массой ( $M_w=50,895$  кДа), после одной стадии хроматографической очистки (рисунок 3). Показана идентичность иммунохимических свойств рекомбинантных Fab фрагментов и полноразмерных антител к кортизолу. Полученный Fab фрагмент антитела к кортизолу использовался в дальнейшем в качестве модельного объекта для разработки системы биотинилирования рекомбинантных антител и создания новых сшитых белковых комплексов. Данные Fab фрагменты могут найти применение в иммунохимических системах для определения стероидного гормона кортизола в биологических жидкостях методами ИФА.

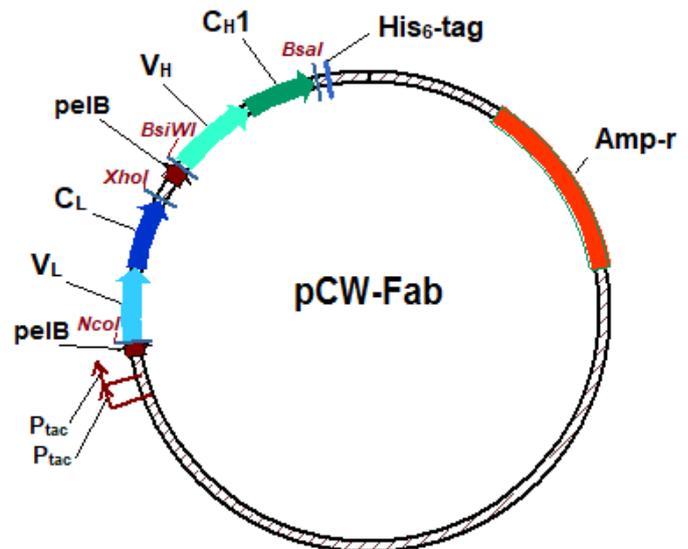
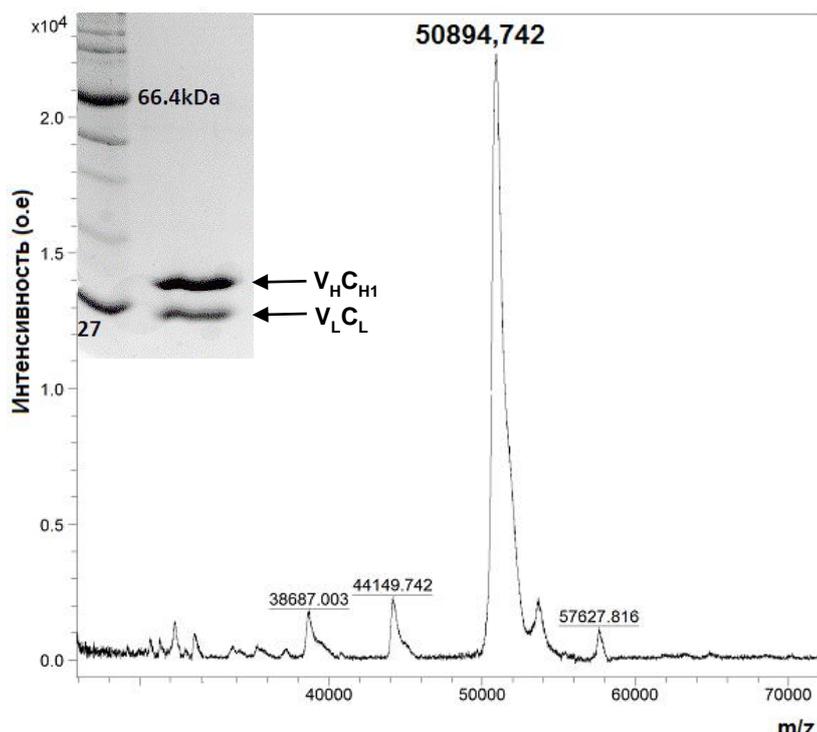


Рисунок 2. – Карта экспрессионного вектора pCW-Fab

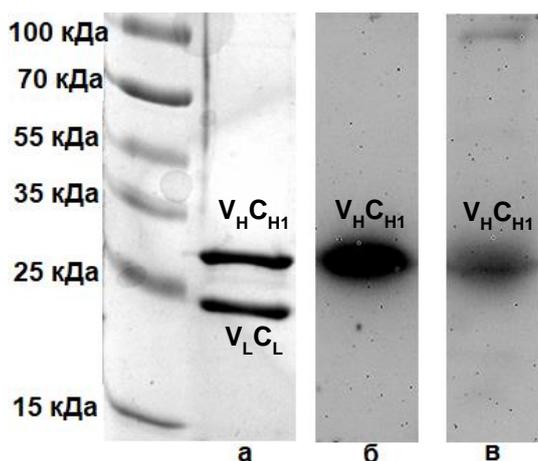


**Рисунок 3. – Масс-спектр и ДДС-ПААГ электрофорез очищенного Fab к кортизолу**

имеет низкую стабильность и не применим для ИФА и иммуно-аффинной хроматографии. Это свидетельствует о том, что не всегда возможно переходить к рекомбинантным фрагментам антител без ущерба для их физико-химических свойств. Повышение стабильности рекомбинантных антител возможно путём замены редких АК в FR регионах и гидрофобных экспонированных АК. Альтернативным подходом являются *in vitro* скрининговые методы получения фрагментов антител с необходимыми физико-химическими свойствами, такие как метод фагового дисплея.

**Получение и характеристика биотинилированного Fab антитела к кортизолу.** Биотинилирование белков широко используется при конструировании различных иммуноаналитических систем. Наиболее распространен метод химической модификации по  $\epsilon$ -аминогруппам остатков лизина, что в ряде случаев может приводить к уменьшению антиген-связывающей способности и стабильности белка, а также к его агрегации. В сконструированный ранее вектор pCW-Fab нами был введён синтетический пептид Avi-tag® (GLNDIFEAQKIEWNE), который сайт-специфически модифицируется биотином с помощью фермента биотин лигазы. Биотинилированные Fab фрагменты антитела к кортизолу выделены с помощью металл-аффинной хроматографии после ко-экспрессии с биотин лигазой в клетках *E.coli BL21*. Вестерн-блоттинг с использованием антител к эпитопу His<sub>6</sub> и стрептавидина, показал, что фрагмент тяжелой цепи содержит полигистидиновый пептид, и способен связывать

Для получения рекомбинантных фрагментов антитела к ТРО использовалась гибридная линия ТПО-F8, продуцирующая антитела к ТРО. Анализ нуклеотидной последовательности выявил наличие нехарактерной АК пролина, неспособной участвовать в образовании  $\beta$ -складчатой структуры в положении H63 C''-D  $\beta$ -складки. В связи с этим, нам не удалось получить Fab фрагмент антитела к ТПО, но был получен scFv фрагмент антитела к ТПО, который связывает антиген, однако

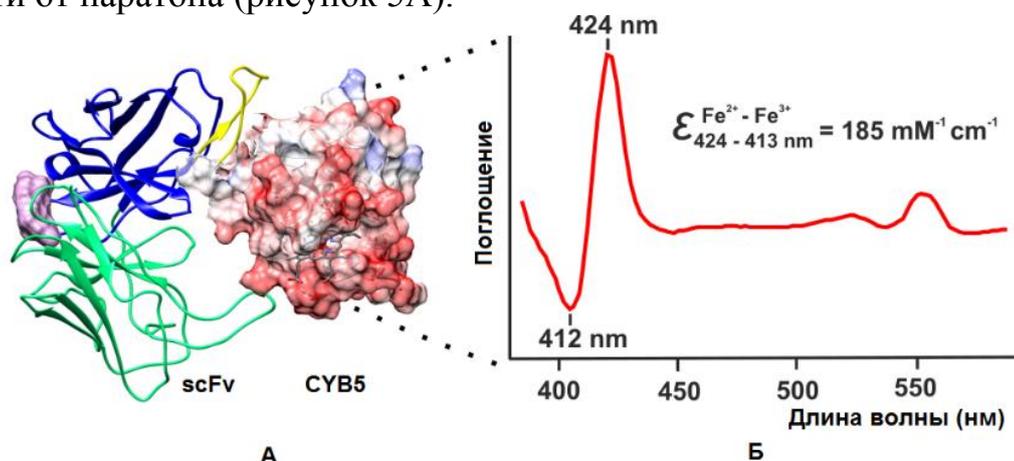


а – кумасси R-250; б – анти-His<sub>6</sub>; в – стрептавидин;

Рисунок 4. – Вестерн-блоттинг препарата Fab к кортизолу

система биотинилирования *in vivo* является универсальной и подходит для получения любых модифицированных биотином Fab фрагментов антител в клетках *E. coli*.

**Конструирование сшитого белкового комплекса фрагментов антител с цитохромом *b<sub>5</sub>*.** Перспективным кандидатом на роль белка слияния, одновременно повышающего растворимость и делающего возможным мониторинг процесса экспрессии антител является гем-связывающий домен цитохрома *b<sub>5</sub>*. *In silico* анализ построенной пространственной структуры белка слияния scFv-b<sub>5</sub> показал, что цитохром *b<sub>5</sub>* не должен оказывать влияния на антиген-связывающие свойства антитела вследствие пространственной удалённости от паратопа (рисунок 5А).



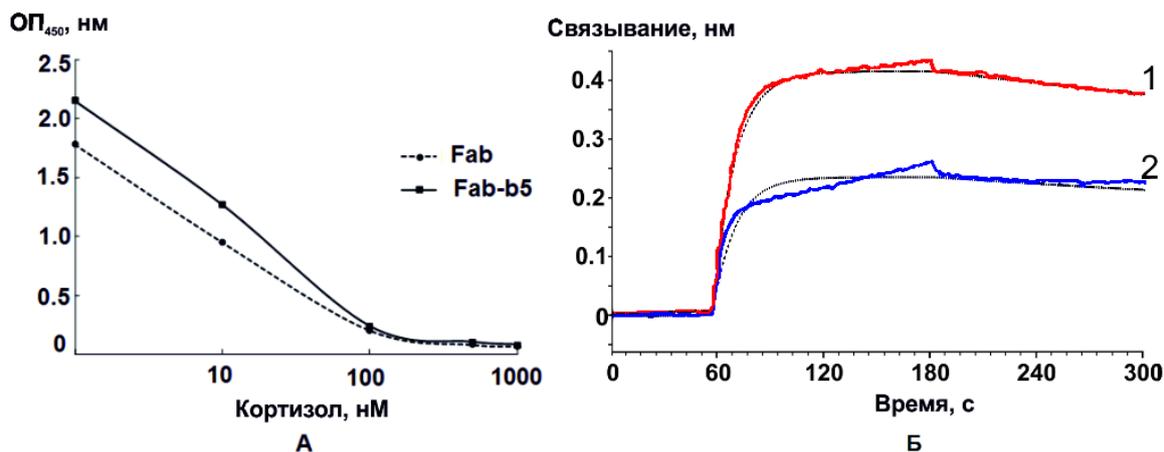
А - молекулярная модель scFv-b<sub>5</sub>; Б - разностный спектр поглощения scFv-b<sub>5</sub>

Рисунок 5. – Сшитый белковый комплекс scFv фрагмент антитела – цитохром *b<sub>5</sub>*

стрептавидин (рисунок 4). Кинетика взаимодействия рекомбинантного антитела с кортизолом изучалась с помощью метода биослойной интерферометрии. Экспериментальные значения констант скоростей ассоциации и диссоциации составили  $1,97 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$  и  $1,08 \cdot 10^{-4} \text{ c}^{-1}$  соответственно, а рассчитанное значение  $K_D$  комплекса рекомбинантного антитела и кортизола, конъюгированного с БСА, оказалось равным  $5,48 \cdot 10^{-10} \text{ M}$ . Эти данные показывают, что полученное рекомбинантное антитело способно обратимо с высоким сродством связывать стероидный гормон кортизол. Важно отметить, что разработанная

Ген цитохрома  $b_5$  крысы амплифицировали с использованием плазмиды pCWori\_MC\_b5rat в качестве матрицы, а затем клонировали в сконструированный ранее вектор pCW-Fab с введением сайта узнавания TEV-протеазы между фрагментом тяжелой цепи антитела и цитохромом  $b_5$ . Для получения рекомбинантного scFv фрагмента антитела к кортизолу переменные  $V_L$  и  $V_H$  фрагменты объединяли через  $(GGGS)_3$  линкер с помощью ПЦР с перекрывающимися областями (SOE-ПЦР). Обнаружено, что после индукции клетки окрашиваются в красный цвет, характерный для цитохрома  $b_5$ , который сохраняется в периплазматической фракции после экстракции и позволяет в реальном времени осуществлять визуальный контроль процессов выделения и очистки белка. Установлено, что случае экспрессии сшитого белка – Fab-b5 выход рекомбинантного белка увеличивается более, чем в два раза по сравнению с Fab фрагментом, не сшитым с цитохромом  $b_5$  (5,33 мг/л и 2,08 мг/л), а в случае scFv-b5 – 3,9 мг/л и 1,43 мг/л. Примечательно, что несмотря на то, что цитохром  $b_5$  слит только с  $V_{H_{C_{H1}}}$  фрагментом, он обладает псевдо-шаперонным действием в отношении мультидоменного Fab фрагмента.

**Свойства сшитых с цитохромом  $b_5$  фрагментов антител.** Показано, что в полученных сшитых белковых комплексах Fab и scFv фрагментов антител с цитохромом  $b_5$  сохраняется характеристический редокс-зависимый спектр поглощения гемопротейна (рисунок 5Б). Высокое значение коэффициента молярной экстинкции для окисленной формы цитохрома  $b_5$   $\epsilon_{413}=117 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  позволяет определять концентрацию сшитого белка в широком диапазоне. Более точное определение концентрации белка возможно путём регистрации разностного спектра  $A_{424-413}$ , используя значение коэффициента молярной экстинкции  $\epsilon_{424-413}=184 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , причём такие параметры раствора как pH или концентрация солей не влияют на это значение. Использование данного подхода позволяет минимизировать вклад других хромофоров и измерять концентрацию в сложных смесях и мутных растворах. Относительное распределение сшитого белка scFv-b5 в клетке определяли регистрацией разностных спектров поглощения  $A_{413-424}$ . Согласно полученным результатам до 70% белка в клетках находится в периплазме в окисленной форме, однако, гем-содержащий белок присутствует и в цитоплазматической фракции. С использованием методов ИФА и биослойной интерферометрии показано, что сшитый белковый комплекс антитела с цитохромом  $b_5$  иммунохимически идентичен несшитым Fab фрагментам антител (рисунок 6).



**А – конкурентный ИФА; Б – сенсограмма взаимодействия Fab-b5 (1 - 50 мкг/мл кортизол-БСА, 2 – 25 мкг/мл кортизол-БСА)**

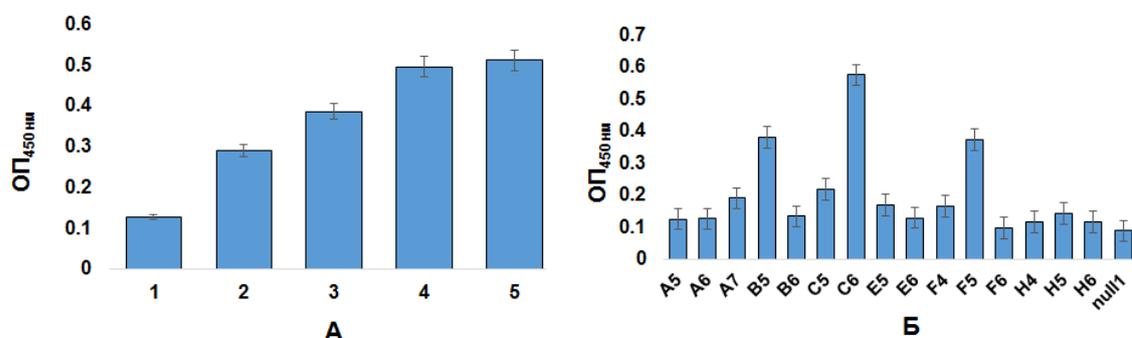
**Рисунок 6. – Анализ связывания Fab-b5 с кортизолом**

Полученные результаты свидетельствуют о том, что сшитый с антителами цитохром *b<sub>5</sub>* не оказывает влияния на их антиген-связывающие свойства, повышает уровень их экспрессии в *E.coli*, делает возможным визуализацию этого процесса для решения оптимизационных задач, позволяет количественно и качественно определять антитела в сложных смесях, а также оценивать окислительно-восстановительный потенциал их окружения.

В главе 4 приведены основные экспериментальные данные по конструированию комбинаторной библиотеки антител, а также использованию фагового дисплея для получения аффинных молекул с заданными свойствами.

**Конструирование комбинаторной библиотеки Fab фрагментов антител и поиск аффинных Fab фрагментов к CYP5A1.** Для определения АК разнообразия CDR участков антител, опосредующих взаимодействие с антигенами, проанализированы структуры комплексов антител с антигенами, входящие в базу данных RCSF PDB (2500 структур). Обнаружено значительное превалирование в этом регионе таких АК как серин, тирозин, глицин и аспарагиновая кислота. Сделано предположение о том, что тирозин и аспарагиновая кислота наилучшим образом подходят для реализации молекулярного узнавания, а небольшие боковые цепи серина и глицина позволяют оптимальным образом разместить их в пространстве паратопа. На основании этой информации сконструирована комбинаторная библиотека гуманизированных Fab фрагментов антител, имеющая разнообразие тирозин/серин в CDR участках. В качестве каркасного антитела для создания библиотеки был выбран Fab фрагмент антитела трастузумаба (4D5), так как он хорошо экспрессируется в бактериальной системе, стабилен, охарактеризован с физико-химической точки зрения и обладает низкой иммуногенностью. После 5

раундов селекции сконструированной библиотеки Fab фрагментов антител идентифицировано 3/24 клонов антител (B5, C6, F5), обладающих по результатам ИФА аффинностью к CYP5A1 (рисунок 7).



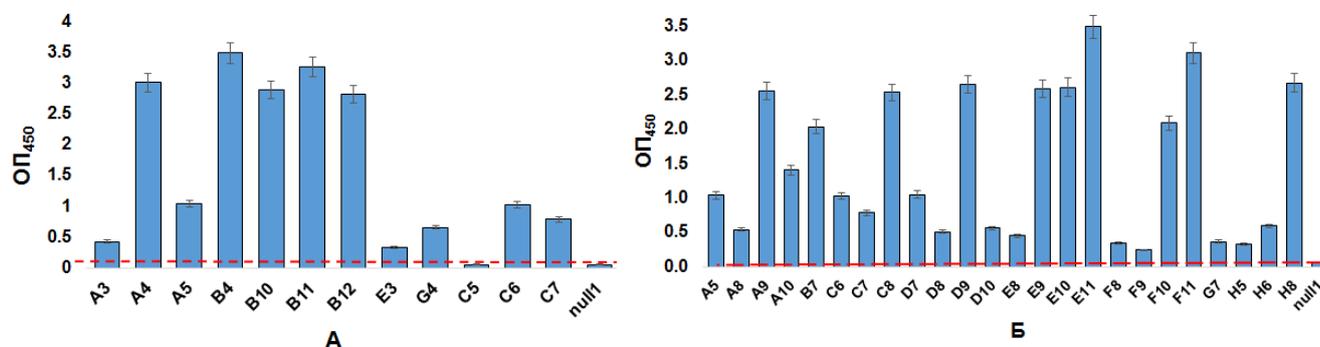
**А - Обогащение библиотеки аффинными клонами; Б - ИФА Fab фрагментов к CYP5A1;  
Рисунок 7. – Получение Fab фрагментов к CYP5A1**

Таким образом, нами показана принципиальная возможность осуществления молекулярного узнавания антителами, содержащими в структуре паратопа всего две различных АК – серина и тирозина. В дальнейшем, идентифицированные клоны планируется использовать для структурно-функционального изучения CYP5A1 с целью выяснения молекулярных механизмов субстратной специфичности и аллостерической регуляции данного фермента.

**Получение аффинных молекул к мишеням белковой природы с помощью фагового дисплея.** С целью обнаружения новых потенциальных механизмов регуляции CYP5A1 и получения специфических аффинных реагентов для протеомных исследований, осуществлён поиск аффинных пептидов с использованием фагового дисплея. В качестве библиотеки использовалась коммерческая комбинаторная библиотека рандомизированных додекапептидов Ph.D.<sup>TM</sup>-12. После четырёх раундов селекции, в ходе которых наблюдалось увеличение содержания аффинных фаговых частиц, отобрано 20 последовательностей. Обнаружено, что 12 из них идентичны и представлены пептидом SGVYKVLVDWQHGGF. Данный пептид был синтезирован методом твердофазного пептидного синтеза, аффинность его связывания с CYP5A1 составляет  $K_D=10^{-8}$  М, при отсутствии связывания с другими цитохромами P450 человека.

Однодоменные антитела (состоящие исключительно из V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub> домена) имеют ряд преимуществ перед Fab и scFv – меньший размер (до 15 кДа), бóльшая стабильность, а также возможность взаимодействовать с эпитопами, недоступными для распознавания обычными антителами. Использование одной комбинаторной библиотеки однодоменных антител (созданной с помощью NNK

рандомизации CDR1-3 на основе стабильного  $V_H$  домена антитела человека VH3-23/D47) позволило получить аффинные однодоменные антитела к мишеням, имеющим прикладное и научно-исследовательское значение – эритропоэтину и соматотропному гормону (рисунок 8).



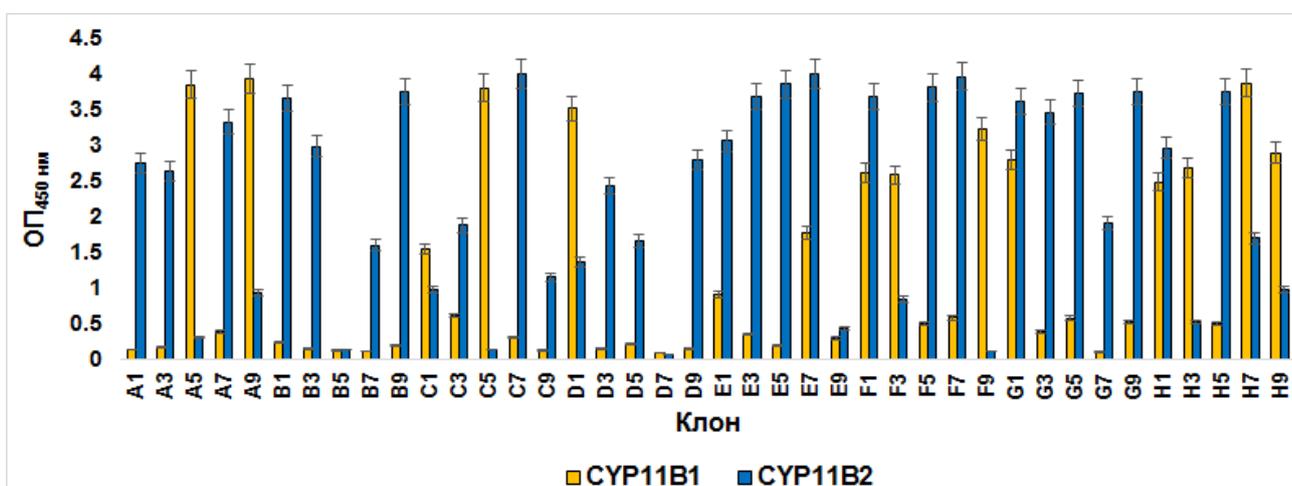
А – ИФА антител к эритропоэтину; Б – ИФА антител к соматотропину

Рисунок 8. – Результаты ИФА анализа однодоменных антител

Однодоменные антитела к эритропоэтину (клон В1) и соматотропину (клон С8) получены в бактериальной системе *E.coli* в препаративных количествах и охарактеризованы. Уровень экспрессии однодоменных антител составил порядка 14 мг на 1 л культуральной жидкости при культивировании в колбах, что значительно превышает показатели, полученные ранее для scFv и Fab фрагментов антител. Рассчитанные равновесные константы диссоциации  $K_D$  составляют  $34 \cdot 10^{-8}$  М и  $4,0 \cdot 10^{-8}$  М для эритропоэтина и соматотропина, соответственно. Таким образом, применение техники фагового дисплея позволило получить антитела к нескольким различным белковым мишеням в рамках одного эксперимента *de novo* - без использования гибридом или иммунизированных лабораторных животных.

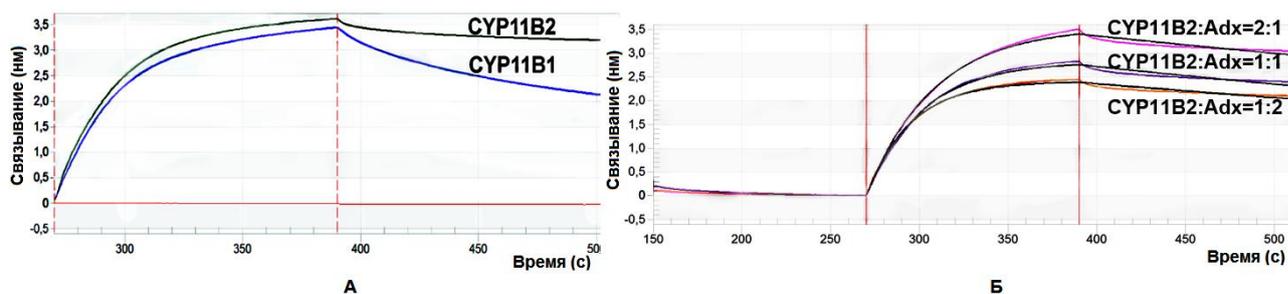
**Получение регио-специфичных однодоменных антител к альдостерон синтазе.** Отличительной особенностью *in vitro* дисплейных методов селекции антител является возможность создания их вариантов, способных дифференцировать незначительные структурные отличия биомолекул. Цитохром P450 11B2 (альдостерон синтаза) – CYP11B2 и цитохром P450 11B1 (стероид 11 $\beta$ -гидроксилаза) – CYP11B1, – ключевые ферменты биосинтеза минералокортикоидов и глюкокортикоидов, обладают 93% идентичностью аминокислотной последовательности. Наличие высоко-специфичных реагентов, способных дифференцировать данные ферменты в модельной системе и в клетках необходимо для поиска молекулярных причин их функциональных отличий и структурно-функциональной характеристики. С целью получения специфичных к CYP11B2 антител, не связывающих CYP11B1, применён подход негативной селекции, заключающийся в предварительной инкубации библиотеки антител с

иммобилизованным СУР11В1 для обеднения библиотеки клонами, обладающими нежелательной кросс-реактивностью. Кроме того, одной из задач являлось получение антител к СУР11В2, конкурирующих за сайт связывания с Adx - редокс-партнёром митохондриальных цитохромов P450. С этой целью, в качестве элюирующего агента использовался 10 мкМ Adx, который вносили в лунки микропланшета после инкубации библиотеки. Значительно большая, по сравнению с антителами, концентрация Adx позволяет элюировать в жидкую фазу только конкурирующие с Adx за связывание с цитохромом P450 варианты антител. Согласно результатам ИФА в пуле присутствуют как клоны антител, связывающие СУР11В1 и не связывающие СУР11В2 (9/40), так и клоны связывающие СУР11В2, но не СУР 11В1 (23/40) (рисунок 9).



**Рисунок 9. – Результаты ИФА скрининга клонов, полученных в результате селекции антител к СУВ11В2 с негативной селекцией на СУР11В1**

Клон G3, который согласно результатам ИФА, содержит антитела, не взаимодействующие с СУР11В1, получен в препаративных количествах для анализа кинетических параметров связывания с антигеном. Анализ кинетики этого взаимодействия, проведенный с использованием метода биослойной интерферометрии на Protein A биосенсоре, показал, что иммобилизованное однодоменное антитело G3 связывает СУР11В2 и СУР11В1 с практически идентичным значением константы скорости ассоциации  $k_{on}$ , однако, наблюдается значительное различие в значении константы скорости диссоциации  $k_{off}$ , что, вероятно, и обуславливает отсутствие связывания СУР11В1 в условиях проведения твердофазного ИФА (рисунок 10).



**А – взаимодействие СYP 11B2 и СYP11B1 с иммобилизованным антителом G3;**

**Б – влияние Adx на связывание СYP11B2 с антителом G3;**

**Рисунок 10. – Взаимодействие СYP11B2 с антителом G3**

Из представленных на сенсограмме данных видно, что повышение концентрации Adx в растворе уменьшает количество СYP11B2 связывающегося с антителом G3, что свидетельствует о конкурентном ингибировании этого связывания, а значит эпитоп СYP11B2, по крайней мере частично, перекрывается с интерфейсом взаимодействия СYP11B2•Adx. Таким образом, можно сделать вывод, что разработанный подход и инструментарий позволяют осуществлять генерацию антител к определённым эпитопам, способных дифференцировать незначительные отличия в структуре белков.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Основные научные результаты исследования

1. Создана экспрессионная система для получения рекомбинантных фрагментов антител в *E.coli*, сконструирован экспрессионный вектор для ко-экспрессионного биотинилирования фрагментов антител с помощью биотин лигазы, экспрессионный вектор для получения сшитых белковых комплексов антител с цитохромом  $b_5$  [2, 4, 17-18].

2. Разработана оригинальная схема клонирования генов иммуноглобулинов с неизвестной последовательностью, включающая в себя высоко вырожденные праймеры, полностью комплементарные не менее, чем 94% всех нуклеотидных последовательностей генов иммуноглобулинов мыши, а также метод двухстадийной ПЦР [2, 5, 11-13].

3. С использованием гибридной линии 5Г-Н2, продуцирующей моноклональные антитела к кортизолу, впервые получен рекомбинантный Fab фрагмент антитела, идентичный по иммунохимическим свойствам полноразмерному. Получен рекомбинантный биотинилированный Fab фрагмент антитела к кортизолу и определены кинетические параметры его взаимодействия с антигеном ( $K_D=5,48 \cdot 10^{-10}$  М) [2, 5-6, 11, 13].

4. Впервые сконструирован и получен сшитый белок, содержащий Fab фрагмент антитела к кортизолу и цитохром  $b_5$ . На основании молекулярной динамики *in silico* доказана пространственная удалённость цитохрома  $b_5$  от паратопа, экспонированность сайта узнавания TEV-протеазы на поверхности белковой глобулы и высокая стабильность сшитого белка. Показано сохранение антиген-связывающих свойств антитела, наличие характеристических спектральных параметров гемопротейна, а также более, чем двукратное увеличение выхода рекомбинантного химерного белка [3-4, 16, 20-22].

5. Проведен биоинформационный анализ аминокислотного состава CDR петель иммуноглобулинов с известной структурой. Обнаружено значительное превалирование таких АК как Tyr/Asp/Ser/Gly. Создана комбинаторная библиотека Fab фрагментов антител человека с минимальным разнообразием в CDR участках паратопа. С использованием данной библиотеки получены антитела к CYP5A1 [5, 7, 9].

6. С использованием фаговой библиотеки рандомизированных додекапептидов впервые идентифицирован пептид с аминокислотной последовательностью SGVYKVLWDWQHGGF, обладающий высоким сродством к CYP5A1 ( $K_D=10^{-8}$  М). С использованием комбинаторной библиотеки однодоменных антител получены антитела к гормонам белковой

природы - эритропоэтину и соматотропному гормону. Получены регио-специфические антитела, способные не только идентифицировать, но и дифференцировать в иммунохимической системе СУР11В2 и СУР11В1 - мембранные белки, обладающие 93% идентичностью АК последовательностей. Данные антитела имеют сайт связывания с СУР11В2, перекрывающийся с Adx [1, 5, 7, 22-23].

### **Рекомендации по практическому использованию результатов**

Полученные Fab фрагменты антител к кортизолу могут быть использованы в диагностических системах для определения кортизола в биологических жидкостях. Идентифицированные в ходе работы антитела к соматотропину и эритропоэтину могут служить основой для создания систем диагностики.

Освоенные в ходе работы подходы к получению антител, а также созданный для этого инструментарий являются универсальными и будут использованы в дальнейшем для создания аффинных молекул для диагностических систем, узнающих модулей химерных антигенных рецепторов, терапевтических биопрепаратов, реагентов для структурно-функциональной характеристики отдельных белков и взаимодействующих белковых комплексов.

На основании результатов, полученных при конструировании рекомбинантных фрагментов антител, разработаны методические указания, которые используются при проведении лекционных занятий по курсам «Молекулярная биотехнология» и «Химия биологически активных веществ» на кафедре биотехнологии и биоэкологии факультета технологии органических веществ Белорусского государственного технологического университета.

**СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ*****Статьи в рецензируемых научных журналах***

1. Пептидный фаговый дисплей в скрининге пептидомиметиков тромбоксан синтазы / Д.О. Дормешкин, А.В. Свирид, А.А. Гилеп, С.А. Усанов // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2015. – Т. 59, №2. – С. 53-61.
2. Получение и характеристика биотинилированного рекомбинантного Fab фрагмента антитела к кортизолу / Д.О. Дормешкин, О.С. Куприенко, А.В. Свирид, А.А. Гилеп, О.В. Свиридов, С.А. Усанов // Биоорганическая химия. – 2016. – Т.42, №1. – С. 22-28.
3. Молекулярное клонирование, гетерологическая экспрессия, выделение и очистка стабильной TEV протеазы / А.В. Свирид, Д.О. Дормешкин, А.А. Гилеп, С.А. Усанов // Молодежь в науке – 2015: прил. к журн. Известия Национальной академии наук Беларуси. – 2017. – №1. – С. 69-73.
4. Development of CYB5-fusion monitoring system for efficient periplasmic expression of multimeric proteins in *Escherichia coli* / D. Dormeshkin, G. Sergeev, A. Gilep, S. Usanov // Protein Expression and Purification. – 2016. – №128. – P. 60-66.
5. Фаговый дисплей в конструировании антител с заданными свойствами / Д. О. Дормешкин, Е.А. Бричко, А.А. Гилеп, С.А. Усанов // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия химических наук. – 2017. – № 2. – С. 93-110.

***Статьи в сборниках научных трудов***

6. Получение рекомбинантных Fab-фрагментов антител, специфичных к кортизолу / Д.О. Дормешкин, В.Н. Леонтьев, И.И. Вашкевич, А.А. Гилеп // Труды Белорусского государственного технологического университета: научный журнал. – 2013. – №4. – С. 231-233.
7. Дормешкин, Д.О. Получение рекомбинантных антител с использованием фагового дисплея / Д.О. Дормешкин, А.А. Гилеп, С.А. Усанов // Биорегуляторы: исследование и применение. Выпуск 3. : сб. науч. тр. / Ин-т биоорганической химии НАН Беларуси ; под ред. чл.-корр. С.А. Усанова. – Минск, 2014. – С. 198-212.
8. Дормешкин, Д.О. Разработка методики получения Fab-фрагментов моноклональных антител/ Д.О. Дормешкин, А.А. Гилеп, С.А. Усанов // Сборник научных работ студентов Республики Беларусь «НИРС – 2013» / Изд. центр БГУ ; под ред. А. И. Жук (пред.) [и др.]. – Минск, 2014. – С. 63-64.
9. Dormeshkin, D.O. Antibody engineering and phage display technology / D.O. Dormeshkin // The EuroBiotech Journal. – 2017. – V.1. – P. 103-104.

10. Пути оптимизации стратегии создания иммунобиологических препаратов на основе программно-целевого планирования / А.С. Владыко, Е.Г. Фомина, Е.П. Счесленок, П.А. Семижон, А.Я. Лущик, Д.О. Дормешкин, А.А. Гилеп // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2017. – Т.6, №2. – С. 213-218.

### ***Материалы конференций***

11. Получение рекомбинантных Fab фрагментов антител к кортизолу / Д.О.Дормешкин, И.И. Вашкевич, А.А. Гилеп, О.В. Свиридов, С.А. Усанов // Материалы V Международной конференции «Химия, структура и функция биомолекул», Минск, 4-6 июня 2014 г. / Институт биоорганической химии НАН Беларуси ; под ред. чл.-корр. С.А. Усанова. – Минск, 2014. – С. 71.

12. Дормешкин, Д.О. Получение рекомбинантных Fab фрагментов антител, специфично связывающих тиреопероксидазу человека / Д.О. Дормешкин // Ресурсо- и энергосберегающие технологии в химической и нефтехимической промышленности : материалы V Международной конференции Российского химического общества имени Д.И. Менделеева, Москва, 29-30 октября 2013г. / РХТУ им. Д.И. Менделеев ; редкол.: А.Ю. Цивадзе [и др.]. – Москва, 2013. – С. 197-198.

13. Combined fluorescent-enzyme conjugate of cortisol and recombinant Fab fragment of monoclonal antibody to cortisol: preparation and interactions in an immunochemical system / O.S. Kuprienko, D.O. Dormeshkin, O.V. Sviridov, A.A. Gilep, S.A. Usanov // Biotechnology: State of the Art and Prospects of Development : Proceedings of the VIII Moscow International Congress, Moscow, Russia, March 17-20, 2015 / JSC “Expo-biochem-technologies” ; ed. board: V.A. Vykov. – Moscow, 2015. – P. 230.

14. Дормешкин, Д.О. Получение и характеристика химерного белка, содержащего Fab фрагмент антитела, слитый с цитохромом b<sub>5</sub> / Д.О. Дормешкин, А.А. Гилеп, С.А. Усанов // Современные проблемы биохимии : сборник материалов конференции молодых ученых-биохимиков с международным участием, посвященный 90-летию со дня рождения академика Ю.А. Островского (29 июня 2015г.) / отв. ред. Л.И. Надольник. – Гродно: ГрГМУ, 2015. – С. 43-44.

15. Получение и характеристика биотинилированного рекомбинантного Fab фрагмента антитела к кортизолу / Д.О. Дормешкин, О.С. Куприенко, О.В. Свиридов, А.А. Гилеп, С.А. Усанов // VII Российский симпозиум «Белки и пептиды» : материалы симпозиума, Новосибирск, Россия, 12–17 июля 2015 г. / ИХБФМ СО РАН; редкол.: В.В. Власов [и др.]. – Новосибирск, 2015. – С. 476.

16. Дормешкин, Д.О. Использование цитохрома b<sub>5</sub> в качестве белка

слияния для получения и характеристики антител с заданными свойствами / Д.О. Дормешкин // IX Международный конгресс “Биотехнология: состояние и перспективы развития”. Материалы конгресса, Москва, 20-22 февраля 2017. – Москва, ООО “РЭД ГРУПП”, 2017. – Т.2. – С. 426-427.

### *Тезисы докладов*

17. Cloning and expression of the recombinant Fab fragment of a monoclonal antibody to the hormone cortisol / D. Dormeshkin, I. Vashkevich, O. Sviridov, A. Gilep, S. Usanov // The 57th Scientific Conference for Young Scientists of Physics and Natural Sciences Open Readings 2014, Vilnius, Lithuania, March 19-21, 2014. / Vilnius University ; ed. board: J. Berzins [et al.]. – Vilnius, 2014 – P. 180.

18. Dormeshkin, D. A novel polystyrene binding peptide from random phage display library / D. Dormeshkin, A. Gilep, S. Usanov // The 58th Scientific Conference for Young Scientists of Physics and Natural Sciences Open Readings 2015, Vilnius, Lithuania, March 25-27, 2015 / Vilnius University ; ed. board: L. Šerkšnytė [et al.]. – Vilnius, 2015 – P. 96.

19. Dormeshkin, D.O. Quantification and localization studies of recombinant antibodies using cytochrome *b<sub>5</sub>* fusion partner / D.O. Dormeshkin, A.A. Gilep, S.A. Usanov // 59th Scientific Conference for Young Scientists of Physics and Natural Sciences Open Readings 2016, Vilnius, Lithuania, March 15-19, 2016 / Vilnius University ; ed. board: A. Aleksišnaitė [et al.]. – Vilnius, 2016 – P. 123.

20. Dormeshkin, D.O. Antibody cytochrome b5 fusion protein, characterization and applications for antibody development process / D.O. Dormeshkin // The FEBS Journal. Special Issue 1: 41st FEBS Congress, Molecular and Systems Biology for a Better Life, Ephesus/Kuşadası, Turkey, September 3-8, 2016 Volume 283. – Turkey, 2016. – P.211-212.

21. Dormeshkin, D.O. Generation of single-domain antibodies to membrane proteins, using novel CYB5 fusion partner and phage display technology / D.O. Dormeshkin, A.A. Gilep, S.A. Usanov // BIOMEMBRANES 2016: Mechanisms of Aging and Age-Related Diseases, Dolgoprudny, Russian, September 26-30, 2016 / MIPT ; ed. board: V. Borshchevskiy [et al.]. – Dolgoprudny, 2016. – P. 89.

22. Svirid, A.V. Identification high-affinity binding peptides for human thromboxane synthase. / A.V. Svirid, D.O. Dormeshkin, A.Y. Lushchyk // BIOMEMBRANES 2016: Mechanisms of Aging and Age-Related Diseases, Dolgoprudny, Russian, September 26-30, 2016 / MIPT ; ed. board: V. Borshchevskiy [et al.]. – Dolgoprudny, 2016. – P. 158.

23. Molecular dynamics study of anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor (CAR) / D. Dormeshkin, M. Shapira, M. Katsin, A. Migas, A. Meleshko, A. Gilep // 7th

WISEGRAD SYMPOSIUM ON STRUCTURAL SYSTEMS BIOLOGY, Nove Hradý,  
Czech Republic, June 21-24, 2017 / Centre for Nanobiology and Structural Biology ;  
ed. board: B. Minofar [et al.]. – Nove Hradý, 2017. – P. 3.



## РЕЗЮМЕ

Дормешкин Дмитрий Олегович

Конструирование рекомбинантных белков, содержащих фрагменты  
моноклональных антител

**Ключевые слова:** рекомбинантные антитела, фаговый дисплей, цитохром *b<sub>5</sub>*, биотинилирование, однодоменные антитела.

**Цель работы:** создание универсальных подходов к получению рекомбинантных фрагментов антител к целевым белкам в бактериальной системе экспрессии *E.coli*.

**Методы исследования:** методы генетической инженерии, фаговый дисплей, спектроскопия поглощения, молекулярная динамика, иммунохимические методы, биослойная интерферометрия.

**Результаты работы и их новизна:** разработана оригинальная схема ПЦР для клонирования генов иммуноглобулинов с неизвестной последовательностью. Получены рекомбинантные Fab фрагменты антитела к кортизолу. Создана система биотинилирования антител в бактериальной системе. Получены и характеризованы биотинилированные Fab фрагменты антитела к кортизолу. Впервые получен сшитый белковый комплекс фрагмента антитела с цитохромом *b<sub>5</sub>*. Показано сохранение антиген-связывающей способности антитела, спектра поглощения гемопротейна, а также более чем двукратное увеличение выхода белка. Сконструирована комбинаторная библиотека Fab фрагментов с минимальным оптимизированным АК разнообразием в паратопе. Показана возможность получения аффинных клонов к мишеням белковой природы. С использованием метода фагового дисплея получены однодоменные антитела с заданными свойствами к ряду мишеней (эритропоэтин, соматотропин, СУР11В2), а также идентифицирован пептид, обладающий высоким сродством к СУР5А1.

**Рекомендации по использованию:** созданные в ходе работы подходы и инструментарий к получению антител являются универсальными и могут быть использованы в дальнейшем для создания аффинных молекул для диагностических систем, узнающих модулей химерных антигенных рецепторов, терапевтических биопрепаратов, реагентов для структурно-функциональной характеристики отдельных белков и взаимодействующих белковых комплексов. Результаты работы внедрены в учебный процесс на кафедре биотехнологии и биоэкологии факультета технологии органических веществ БГТУ.

## РЭЗЮМЭ

Дармешкін Дзмітрый Алегавіч

Канструяванне рэкамбінантных бялкоў з фрагментамі монакланальных антыцел

**Ключавыя словы:** рэкамбінантныя антыцелы, фагавы дысплей, цытахром *b<sub>5</sub>*, біяцінаванне, аднадаменныя антыцелы.

**Мэта даследавання:** стварэнне універсальных падыходаў да атрымання рэкамбінантных фрагментаў антыцел да мэтавых бялкоў у бактэрыяльнай сістэме экспрэсіі *E.coli*.

**Метады даследавання:** метады генетычнай інжынерыі, фагавы дысплей, спектраскапія паглынання, малекулярная дынаміка, іммунахімічныя метады, біяслойная інтэрфераметрыя.

**Атрыманыя вынікі і іх навізна:** распрацавана арыгінальная схема палімеразнай ланцуговай рэакцыі для кланавання генаў імунаглабулінаў з невядомай паслядоўнасцю. Атрыманы рэкамбінантныя Fab фрагменты да картызолу. Створана сістэма для біяцінавання антыцелаў у бактэрыяльнай сістэме. Атрыманы і характарызаваны біяцінаваныя Fab фрагменты да картызолу. Упершыню атрыманы зліты бялковы комплекс фрагмента антыцела з цытахромам *b<sub>5</sub>*. Паказана захаванне антыген-звязуючай здольнасці, спектру паглынання гемапратэіну, а таксама двухразовае павелічэнне выхаду бялку. Сканструявана камбінаторныя бібліятэка Fab фрагментаў з мінімальнай амінакіслотнай разнастайнасцю ў паратопе. Паказана магчымасць атрымання афінных клонаў да мішэняў бялковага паходжання. С выкарыстаннем метаду фагавага дысплею атрыманы аднадаменныя антыцелы з зададзенымі ўласцівасцямі да шэрагу мішэняў (эрытрапаэцін, самататрапын, СYP11B2), а таксама ідэнтыфікаваны пептыд, афінны да СYP5A1.

**Рэкамендацыі па выкарыстанні:** створаныя ў ходзе работы падыходы і інструментарый да атрымання антыцелаў з'яўляюцца універсальнымі і могуць быць выкарыстаны ў далейшым для стварэння афінных малекул для дыягнастычных сістэм, пазнаючых модуляў хімерных антыгенных рэцэптараў, тэрапеўтычных біяпрэпаратаў, рэагентаў для структурна-функцыянальнай характарыстыкі асобных бялкоў і ўзаемадзеянняў бялковых комплексаў. Вынікі працы ўкаранены ў навучальны працэс на кафедры біятэхналогіі і біяэкалогіі факультэта тэхналогіі арганічных рэчываў БДТУ.

## SUMMARY

Dormeshkin Dmitri Olegovich

Development of recombinant proteins containing monoclonal antibodies fragments

**Keywords:** recombinant antibodies, phage display, cytochrome *b<sub>5</sub>*, biotinylation, single-domain antibodies.

**Aim of the work:** development of universal approaches to recombinant antibody fragments generation and production in the bacterial expression system.

**Methods of the research:** genetic engineering methods, phage display, absorbance spectroscopy, molecular dynamics, immunochemical methods, biolayer interferometry.

**Results and their novelty:** an original PCR scheme for immunoglobulin genes with unknown sequences cloning was developed. Recombinant Fab fragments to cortisol were generated. A biotinylation system of antibodies in a bacterial system has been developed, biotinylated Fab fragment to cortisol was generated and characterized. A novel antibody cytochrome *b<sub>5</sub>* protein was developed. The preservation of the antigen-binding capacity of antibody and the absorption spectrum of the hemoprotein were revealed, as well as a double increase in the yield of the protein. A synthetic Fab library with minimal rational diversity in paratope was developed and affine clones to protein target were isolated. Single-domain antibodies with desired properties to erythropoietin, somatotropin and CYP11B2 were generated utilizing phage display method. We also succeeded in identification of peptide with high affinity to CYP5A1.

**Application guidelines:** approaches and tools that was developed during this work are universal and could be used for affine molecules development for diagnostic systems, chimeric antigen receptors, biotherapeutics and reagents for the structural and functional characteristics of individual proteins and interacting protein complexes. The results are used in special course at the biotechnology and bioecology department of the Organic Substances Technology Faculty of the BSTU.