

**Горайнова Оксана Сергеевна**

**ПОЛУЧЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОДНОДОМЕННЫХ  
РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ  
ЭФФЕКТИВНОСТИ ИССЛЕДОВАНИЙ БЕЛКОВ-МАРКЕРОВ В КРОВИ  
ЧЕЛОВЕКА**

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва - 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биологии гена Российской академии наук.

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук

**Тиллиб Сергей Владимирович**

**Официальные оппоненты:**

**Филатов Александр Васильевич** – доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, лаборатория иммунохимии (№ 23), заведующий подразделением.

**Микаелян Арсен Суменович** – кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, лаборатория проблем регенерации, группа молекулярно-генетических основ онтогенеза, руководитель группы, старший научный сотрудник.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Защита диссертации состоится «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании Диссертационного совета Д.208.046.02 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10 и на сайте: <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г.

**Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат медицинских наук**

**Новикова Лидия Ивановна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Кровь – это жидкая ткань, осуществляющая в организме транспорт кислорода и других химических веществ. Она интегрирует в единую систему биохимические процессы в различных клетках, а также выполняет ряд важных функций: транспортную, защитную, регуляторную и другие. Благодаря этому кровь взаимодействует со всеми органами и тканями, что делает её наиболее информативным и универсальным биоматериалом для мониторинга патологических изменений и процессов в организме. При этом наиболее важной диагностической составляющей являются белки плазмы крови. На 2014 год было описано и каталогизировано около 12130 таких белков [Marshall J. et al., 2014]. Однако, несмотря на такое разнообразие, всего 22 белка составляют 99% тотальной белковой массы крови [Prieto D.A. et al., 2014]. К ним относятся альбумин, иммуноглобулины, фибриноген, трансферрин и др. С одной стороны, эти высокопредставленные («highly abundant») белки и связанные с ними специфические субпротеомы и небелковые молекулы сами по себе могут являться важными диагностическими маркерами. С другой, их присутствие в плазме и сыворотке создаёт помехи («интерференции») при анализе низко представленных белков, некоторые из которых особенно часто сегодня рассматриваются как специфические биомаркеры различных заболеваний. Подобные интерференции могут варьировать от пациента к пациенту и, таким образом, приводить к неверным (ложноположительным или ложноотрицательным) результатам при проведении различных лабораторных анализов сыворотки или плазмы крови. Весьма распространённой технологией, используемой в клинической лабораторной диагностике, является иммуноферментный анализ (ИФА) — метод, служащий для обнаружения целевого вещества в растворе, в том числе и в биологических жидкостях. Данная технология может требовать тщательной предварительной пробоподготовки, поскольку является высокочувствительной и восприимчивой к различным вмешательствам и помехам. Специфическая предобработка анализируемой пробы крови, в частности, удаление из неё белков, таких, как «гетерофильные антитела» и других, потенциально способных внести существенные помехи в детектируемый сигнал, может приводить к повышению надежности и чувствительности анализа при подобном тестировании. Получение достоверных результатов при проведении диагностических анализов, в частности, ИФА, является актуальной задачей для клинической иммунологии.

Предполагается, что эффективным инструментом для данных целей являются иммуносорбенты, работающие на основе использования особых однодоменных антител («nanobodies», называемых в русскоязычных статьях как «нанотела» или «наноантитела»). Наноантитела – рекомбинантные белки, являющиеся производными однодоменных антиген-узнающих переменных фрагментов особых антител, состоящих из димера укороченных тяжелых цепей, при этом лёгкие цепи у них полностью отсутствуют. Наряду с обычными антителами, наноантитела в норме присутствуют у представителей семейства *Camelidae* (Верблюдовые), акул и некоторых

других видов хрящевых рыб. Особые свойства неканонических однодоменных антител могут обеспечивать им определенные преимущества по сравнению с классическими антителами и их производными для некоторых практических приложений [Тиллиб С.В., 2011; Hamers-Casterman C. et al., 1993; Arbabi Ghahroudi M. et al., 1997; Muylldermans S., 2013; Steeland S. et al., 2016]. Их небольшой размер и способность к формированию необычных выступающих паратопов (благодаря удлинённому третьему гипервариабельному участку, CDR3) могут обеспечивать доступ к участкам молекулы антигена необычной формы или к труднодоступным конформационным эпитопам (активным центрам белков, небольшим углублениям). Привлекательными особенностями этих антител являются их высокая растворимость, устойчивость к жёстким условиям среды, способность к ренатурации, что обеспечивает их более высокую стабильность по сравнению с классическими антителами, и, соответственно, возможность их многократного использования. Малый размер наноантител упрощает различные генно-инженерные модификации с ними: например, добавление олигонуклеотидных линкеров разной длины оптимизирует работу наноантител в иммобилизованном состоянии, присоединение дополнительных тэгов облегчает их очистку и детекцию, а дополнительные аминокислотные последовательности обеспечивают гомо- или гетеро- димеризацию/олигомеризацию наноантител, что увеличивает их avidность и специфичность узнавания. Благодаря эффективности процедуры генерирования и отбора, а также простоте наработки, наноантитела являются экономически эффективным инструментом.

#### **Степень разработанности темы исследования**

На сегодняшний день существуют комбинированные иммуносорбенты на основе классических антител, которые связывают и удаляют от 6 до 20 мажорных белков крови (MARS «Top-6» (Agilent, США), ProteoPrep-20 (Sigma Aldrich, США)). Однако данные коммерческие продукты не являются идеальными. Первый и общий минус этих систем заключается в отсутствии возможности избирательно связывать и удалять единственный целевой белок, а не группу белков. Антитела, используемые в аффинных колонках MARS «Top-6», являются поликлональными, поэтому, в отличие от моноклональных антител, они могут менять степень специфичности с течением времени. Система ProteoPrep-20 довольно эффективно удаляет > 98% высокопредставленных белков, однако при этом наблюдается частичное истощение целевых белков в препарате плазмы крови, что также не является желательным для их последующей диагностики.

Отсутствие высокоэффективных коммерческих иммуносорбентов для специфического связывания и выделения конкретных заданных белков крови, риск потери диагностически важных биомаркеров из препарата плазмы или сыворотки при подобных предварительных обработках, высокая чувствительность последующих диагностических анализов (таких, как ИФА) к присутствию в анализируемом препарате белков, дающих фоновые сигналы, явились основными побудительными мотивами данного исследования, направленного на разработку новых материалов и методов для преодоления указанных проблем.

## **Цель работы**

Целью работы явилось получение и исследование новых реагентов и методов на основе однодоменных антител, специфически связывающих заданные высокопредставленные или низкопредставленные белки крови, для повышения эффективности диагностических анализов биомаркеров в крови человека.

## **Задачи исследования**

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи.

1. Разработать процедуру последовательного поэтапного генерирования однодоменных антител к различным высокопредставленным белкам плазмы крови человека.

2. Получить библиотеки кДНК-последовательностей, кодирующих вариабельные антиген-узнающие домены особых неканонических иммуноглобулинов двугорбых верблюдов, иммунизированных сначала исходной, а затем и истощенной плазмой крови человека. Методом фагового дисплея отобрать те варианты последовательностей, которые кодируют однодоменные антитела (одАт), связывающиеся с заданными белками плазмы крови, затем наработать, форматировать и охарактеризовать специфические свойства полученных одАт.

3. Выделить и очистить отобранные модифицированные одАт, создать на их основе высокоспецифичные иммуносорбенты, способные связывать определенные высокопредставленные белки крови.

4. Продемонстрировать возможность использования полученных новых реагентов (наноантител и получаемых на их основе иммуносорбентов) для специфических предобработок/истощений сыворотки или плазмы крови и для специфического обогащения/выделения мажорного или маркерного белка и ассоциированных с ним молекул.

5. Экспериментально оценить потенциал использования получаемых на основе одАт иммуносорбентов для повышения эффективности иммуноферментных диагностических анализов, а именно, для удаления/выделения высокопредставленных белков из плазмы крови путём иммуноаффинной хроматографии с целью последующей детекции в получаемых предобработанных образцах крови диагностических биомаркеров методом иммуноферментного анализа.

## **Научная новизна работы**

Впервые описана квазициклическая процедура последовательного поэтапного генерирования однодоменных антител (наноантител) к основным антигенам сложной субпротеомной смеси на примере генерирования наноантител к ряду высокопредставленных белков плазмы крови человека.

Проведены последовательные стадии селекции, в результате чего впервые получены новые высокоспецифичные однодоменные антитела, узнающие ряд мажорных белков плазмы крови человека (сывороточный альбумин, IgG, IgA, IgM, фибриноген, альфа-2-макроглобулин, трансферрин).

Получены новые иммуносорбенты на основе однодоменных антител, позволяющие осуществлять высоко специфическое удаление или обогащение конкретного плазматического белка.

Показана эффективность предобработки плазмы крови с помощью полученных иммуносорбентов для последующего иммуноферментного анализа на примере диагностически важного белка лактоферрина.

Продемонстрирована возможность использования полученных иммуносорбентов для предобработки плазмы крови с целью последующей детекции низкопредставленных белков на примере карциноэмбрионального антигена.

Получены однодоменные антитела к диагностически важному белку интерлейкину-6 с целью их дальнейшего использования для специфического обогащения или выделения заданного маркерного белка и ассоциированных с ним молекул.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Использованные в работе технологические подходы по получению новых реагентов (однодоменных антител – наноантител) и разработке методов на их основе имеют большое теоретическое значение. Технология создания и адаптации наноантител для решения различных медико-биологических задач – принципиально новый и очень перспективный инструмент молекулярной иммунологии, в первую очередь для получения новых материалов для исследований, диагностики и создания новых иммунотерапевтических препаратов и вакцин нового поколения.

Предобработка плазмы крови может улучшить эффективность анализа биомаркеров с помощью масс-спектрометрических методов, а также повысить чувствительность детекции исследуемых белков с помощью иммунохимических методов, в частности, иммуноферментного анализа. Препараты плазмы и сыворотки крови, из которых удалены некоторые мажорные белки, могут быть более подходящими образцами для постановки иммуноферментного анализа по сравнению с необработанными препаратами. Уровень неспецифического фонового сигнала и вероятность возможных интерференций в таких образцах могут оказаться значительно сниженными, что, в свою очередь, качественно повысит достоверность проводимых диагностических анализов.

Разработанные технологии и методы/подходы имеют важное практическое значение. Полученные наноантитела (рекомбинантные V<sub>H</sub>H-домены) к определенным высокопредставленным белкам крови позволят специфически удалять данные белки, вносящие помехи в диагностические анализы, или же наоборот, выделять конкретный высокопредставленный белок и ассоциированные с ним субпротеомы.

С помощью полученных в данной работе однодоменных антител и иммуносорбентов на их основе возможно выделение и исследование субпротеомов, связанных с заданными высокопредставленными белками плазмы крови человека. Используя антитела к сывороточному альбумину, иммуноглобулину G, иммуноглобулину A, иммуноглобулину M, фибриногену, альфа-2-макроглобулину,

трансферрину можно определять фракции антигенов, находящихся в свободном или связанном с каким-либо из перечисленных белков состоянии.

Возможно создание искусственных биспецифических антител или иных конъюгатов, одним из компонентов которых может быть однодоменное антитело к какому-либо высокопредставленному белку плазмы крови. Это увеличит период циркуляции конъюгата «наноантитело-(про)лекарство/наноантитело» в крови и обеспечит доставку препарата в целевые органы и ткани.

Специфическое удаление некоторых белков может повысить стабильность препаратов плазмы крови и обеспечить их лучшую сохранность в лабораторных условиях.

Однодоменные антитела, высокоспецифически связывающие провоспалительный цитокин интерлейкин-6 потенциально могут быть использованы для повышения эффективности и надёжности некоторых методов его детекции, используемых в клинической лабораторной диагностике.

Учитывая высокий потенциал описанной технологии, сведения о наноантителах, методах их получения и использования могут войти в состав специализированных биотехнологических курсов в высшей школе и курсов повышения квалификации.

#### **Методология и методы исследования**

В работе использовались современные методы молекулярной биологии, молекулярной иммунологии и микробиологии, такие как молекулярное клонирование, технология бактериофагового дисплея, хроматографические методы, энзимологические и биохимические методы, методы иммуноферментного анализа.

**Иммунизация верблюда.** В качестве антигенного материала для иммунизации, обогащенного высокопредставленными белками, была использована плазма периферической крови здоровых доноров. Образцы плазмы были предоставлены Медицинским радиологическим научным центром им. А.Ф. Цыба – филиалом ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. В качестве антикоагулянта использовался гепарин (50 ед./мл). Непосредственно перед иммунизацией 200 мкл плазмы крови, разведенной до 5 мл в PBS смешивали с равным объемом адъюванта (Adjuvant LQ, «Gerbu Biotchnik»). Иммунизация верблюда проводилась подкожно согласно следующей схеме: 5 последовательных подкожных инъекций антигенного материала=> инъекции через 3 недели после первой => последующие три стадии с 10-дневными интервалами.

Спустя 5 дней после последней иммунизации отбирали 150 мл периферической крови из яремной вены верблюда. Для предотвращения свертывания кровь сразу же разводили равным объемом PBS, содержащим гепарин (100 ед./мл.) и ЭДТА (3 мМ). Эффективность проведённой иммунизации была подтверждена с помощью иммуноферментного анализа иммунной сыворотки. Проводился анализ роста титра антител к заданным антигенам по сравнению с неиммунной сывороткой.

Клонирование репертуара кДНК-последовательностей однодоменных антител проводили по следующей схеме: отбор крови из яремной вены иммунизированного

верблюда, выделение из неё моноклеарной фракции (лимфоцитов), синтез кДНК, проведение двухстадийной ПЦР с использованием специфических праймеров, рестрикция и очистка вставок VNH, встраивание генов наноантител в вектор для фагового дисплея, трансформация бактерий.

**Выделение В-лимфоцитов, выделение РНК и синтез кДНК.** 35 мл раствора крови верблюда наслаивали на ступеньку специальной среды (Histopaque-1077, Sigma) объемом 15 мл и плотностью 1,077 г/мл, после чего проводили центрифугирование при 800 g, 20 минут. Лимфоциты и моноциты (моноклеарные клетки крови) отбирали из интерфазной зоны плазма/Histopaque, затем промывали буфером PBS, с добавлением 1 мМ ЭДТА. С помощью реактива TRIzol Reagent (Invitrogen) из В-лимфоцитов выделяли суммарную РНК. Поли(А)-содержащую РНК очищали от тотального препарата с помощью колонки с олиго(dT)-целлюлозой. Количество и качество выделенной РНК проверяли при помощи спектрофотометрического анализа и с помощью электрофоретического фракционирования выделенной РНК в 1,5% агарозном геле с формальдегидом. При помощи праймера олиго(dT) и обратной транскриптазы М-MuLV (без РНКазы Н) проводилась реакция обратной транскрипции по стандартному протоколу [Sambrook J. et al., 1989].

**Встраивание генов наноантител в вектор для фагового дисплея. Создание фаг-дисплейных библиотек.** В качестве матрицы для проведения двухступенчатой полимеразной цепной реакции использовали полученные продукты обратной транскрипции. Варибельные домены однодоменных антител были амплифицированы парой праймеров, комплементарных экзону СН2 домена антитела и лидерной последовательности. После этого ПЦР-продукт, соответствующий размеру VNH (~650кДа) амплифицировали повторно, используя отжигающиеся по краям VH фрагмента праймеры. Продукты амплификации клонировали по сайтам NcoI (PstI) и NotI в фагмидный вектор рHEN4, любезно предоставленный проф. Муйлдермансом (S. Muyldermans, Vrije universiteit Brussel, Belgium) [Hamers-Casterman C. et al., 1993; Saerens D. et al., 2004; Rothbauer U. et al., 2006]. Клетки *E.coli* (штамм TG1) трансформировались лигазной смесью и высевались на чашки Петри с LB-агаром с добавлением селективного антибиотика. Бактериальные клетки данного штамма содержат на своей поверхности F-пили, что является важным фактором для продукции нитчатых бактериофагов. Выросшие на чашке колонии счищались и хранились в LB-среде с добавлением 50% глицерина при -80°C.

**Амплификация фаговых частиц.** Полученный сток бактерий, содержащих фагмиду рHEN4, высевали в 300 мл среды 2×YT, содержащей ампициллин и глюкозу (Sigma Aldrich, США), с целью амплификации фаговых частиц. 1%-ная глюкоза необходима для ингибирования экспрессии гена рIII, содержащегося в фагмидном векторе, одна из функций которого заключается в минимизации супер-инфекции заражённой бактерии. Культуру инкубировали при 200 об/мин, 37°C до оптической плотности 0,5-0,6 (2-3 часа), после чего заражали её фагом-помощником M13K07 (New England Biolabs, США) [Van der Linden R.H. et al., 1999]. С целью эффективного



заражения клеток бактерий фагом-помощником и развития устойчивости к канамицину культуру в колбе инкубировали 30 минут при комнатной температуре. После этого к культуре добавляли 70-100 мкг/мл канамицина и инкубировали при +37°C, 200 об/мин на термостатированной стационарной качалке 16-18 часов. Затем культуру центрифугировали при 4000 g 30 минут, а к супернатанту с целью осаждения фагов добавляли 0,25 объёма раствора 20%PEG/2.5MNaCl, тщательно перемешивали и инкубировали в ледяной бане 30 минут. Последующим центрифугированием при 4000 g в течение 30 минут отделяли преципитированный фаг, который ресуспендировали в PBS.

**Селекция библиотеки.** Селекцию библиотеки проводили методом модифицированного фагового дисплея [Тиллиб С.В. с соавт., 2010; Arbabi Ghahroudi M. et al., 1997; Conrath К.Е. et al., 2001; Nguyen V. K. et al., 2001; Saerens D. et al., 2004].

На микропланшет из полистирола с высокой белковой сорбцией (Nunc MaxiSorp, Thermo Fisher Scientific, США) наносили антиген, растворённый в PBS, исходя из расчёта 10 мкг антигена на лунку. Антиген инкубировали в планшете в течение 12 часов при +4°C. Затем лунки промывали и блокировали. Блокировку проводили в течение ночи при +4°C или 1 час при комнатной температуре, для чего использовали 1% раствор либо БСА (Sigma-Aldrich, США), либо казеина (Bio-Rad, США), растворённых в PBS. Затем из расчёта  $\sim 10^{10}$ - $10^{11}$  частиц в 100 мкл на лунку добавляли фаг и инкубировали 1 час при комнатной температуре. Многократной промывкой PBS и PBS с 0,05% Tween-20 (PBST) отмывали неспецифически сорбированные фаги. Связавшиеся фаги элюировали в свежеприготовленном растворе 1,5% триэтиламина в воде в течение 3-5 минут. Элюат переносили в пробирки с равным объёмом нейтрализующего раствора 1M Tris·HCl, pH 8.0. Элюат бактериофагов использовали для определения титра связавшегося бактериофага, а также для амплификации для следующего раунда селекции.

Для определения титра бактериофага клетки *E.coli*, находящиеся в логарифмической стадии роста, смешивали с равным объёмом суспензии фага и инкубировали в течение 40 минут без перемешивания. После этого высевали полученный препарат на квадратную чашку с агаром (среда LB) в серийных десятикратных разведениях и помещали на ночь в термостат при 37°C. Подсчёт колоний производили на следующий день.

Для амплификации элюированных фаговых частиц ими заражали 1-2 мл TG1-клеток (подростших до оптической плотности 0,5-0,7 при длине волны 600), инкубировали 30 минут при комнатной температуре, затем добавляли ампициллин в концентрации 100 мкг/мл и 1% глюкозы. Затем заражали клетки фагом-помощником M13K07 (New England Biolabs, США) [Vieira J. et al., 1987]. Через 30 минут инкубации при 37°C заражённые клетки переносили в большой объём среды (100-300 мл) с канамицином и ампициллином. Клетки инкубировали в термостатическом шейкере в течение ночи при 37°C, 200 об/мин. Проводили два-три раунда селекции.

Анализ способности полученных клонов узнавать заданный антиген проводили с помощью иммуноферментного анализа [Тиллиб С.В. с соавт., 2010; Conrath К.Е. et al.,

2001; Saerens D. Et al., 2004]. В препаративных количествах нарабатывали периплазматический экстракт, содержащий VHH с последовательностью гемагглютининового тэга (HA-тэг) на С-конце, которая необходима для специфической детекции получаемого белка с помощью соответствующих коммерческих антител. Коммерческие анти-HA-моноклональные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, использовали в качестве вторичных антител к HA-тэгу (ИМТЕК, Россия). Для иммобилизации антигена в течение ночи при +4°C или 1,5 часа при комнатной температуре использовали 96-луночные микропланшеты из полистирола Nunc MaxiSorp (Thermo Fisher Scientific, США). Затем лунки три раза промывали раствором PBST. Блокировку проводили в течение ночи при +4°C или 1 час при комнатной температуре, для чего использовали 1% раствор либо БСА, либо казеина, либо обезжиренного сухого молока, растворённых в PBS. В контрольные лунки не добавлялся антиген, при этом они блокировались и подвергались дальнейшим стадиям анализа параллельно с экспериментальными образцами. Для детекции визуального сигнала, возникающего в результате активности фермента пероксидазы хрена, использовали субстрат ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат). При длине волны 405 нм измеряли оптическую плотность.

#### ***Фингерпринтный анализ отобранных вариантов однодоменных антител.***

Вначале проводили амплификацию нуклеотидных последовательностей VHH с помощью ПЦР, используя ДНК-материал единичных колоний. Стандартную реакцию проводили в объёме 15 мкл, для амплификации индивидуальной последовательности однодоменного антитела использовались прямой праймер гР (5'-cacacaggaaacagctatgac-3') и обратный праймер GIII (5'-ccacagacagccctcatag-3').

С помощью электрофореза в агарозном геле проводили анализ полученных в результате амплификации фрагментов ДНК. В случае, если размер фрагмента был ожидаемым (около 650 пар оснований), данный ПЦР-продукт параллельно обрабатывался тремя частощепящими рестриктазами (HinfI, MspI, RsaI). На первоначальных этапах анализа такая процедура является альтернативой секвенирования, поскольку данные рестриктазы узнают разнообразные сайты, которые варьируют в CDR3 гипервариабельных участках индивидуальных наноантител. Соответственно, различаются и электрофореграммы получающихся фрагментов ДНК.

Для проведения реакции использовались 3 мкл ПЦР-продукта, буфер, оптимальный для каждого используемого фермента, 1-5 ед. рестриктазы, H<sub>2</sub>O (mQ). В течение 1-2 часов реакционные смеси инкубировали в термостате при 37°C, и в таком случае для каждого варианта использовалось 3-5 ед. рестриктазы, либо же смеси инкубировали при 37°C в течение 16-18 часов, для чего использовалось 1-3 ед. рестриктазы. Методом горизонтального гель-электрофореза в 2,5%-ном агарозном геле анализировались продукты реакции, для чего три варианта рестрицированной ДНК каждого проанализированного индивидуального клона наносили в соседние дорожки геля. В качестве маркера использовалась смесь «GeneRuler Low Range DNA Ladder» (Thermo Fischer Scientific, США).

**Продукция и очистка рекомбинантных однодоменных антител.** С целью получения экспрессионного вектора к 3'концу последовательности однодоменного антитела добавляли вставку, содержащую полигистидиновый (гексагистидиновый, His<sub>6</sub>) тэг. Для этого проводили рестрицирование фагмиды рНЕН4 по сайтам EcoRI и BstEII (в случае наличия множественных сайтов рестрикции, фагмиду рестрицировали по другим сайтам, в каждом конкретном «нестандартном» случае рестриктазы подбирались индивидуально). Продукты рестрикции анализировали при помощи горизонтального гель-электрофореза, а выделение фрагментов ДНК правильного размера из агарозного геля и последующую очистку фрагментов осуществляли с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, США) по стандартной методике производителя. Затем проводили реакцию лигирования вектора и вставки при 20°C в течение двух часов. Полученным вектором, несущим в себе последовательность антитела, трансформировался штамм *E.coli* XL1.

Периплазматический экстракт готовили по стандартным протоколам с небольшими модификациями [Saerens D. et al., 2012]. Единичную клеточную колонию высевали в 3-30 мл среды LB, содержащую 100 мкг/мл ампициллина и 1/200 долю 20% глюкозы. Добавление глюкозы в экспрессионную культуру значительно снижает или устраняет возможность неконтролируемой автоиндукции белка за счёт дезактивации лактозного оперона. Клетки выращивали в течение дня (в среднем, 6 часов) в термостатированной стационарной качалке при 180 об/мин и 37°C до достижения высокой оптической плотности культуры. После этого культуру клеток пересевали в одну или несколько 800-миллилитровых колб, содержащих 200 мл более богатой среды 2xYT или TB с добавлением 50-100 мкг/мл ампициллина и 1/200 доли 20% глюкозы. Колбы помещали в термостатированную стационарную качалку, где они инкубировались при 180 об/мин, 37°C. При достижении клетками плотности 0,6 при длине волны 600 в среду добавляли 0,2-0,5мМ раствор изопропил-бета-D-галактопиранозиды (ИПТГ) с целью индукции экспрессии белка. Температуру снижали до 28-30°C и инкубировали клетки в течение 16-18 часов. Затем выросшие клетки центрифугировались 15 мин при 3000 g. В данной работе использовались экспрессионные векторы рНЕН4 и рНЕН6. В состав данных векторов входит лидерная (сигнальная) последовательность PelB. Она направляет синтезированные полипептиды и белки в периплазму *E. coli*. Для возможности выделения белка из периплазматического пространства бактериальных клеток необходимо создать особые условия осмотического шока, когда внешняя клеточная мембрана разрушается, при этом клеточная стенка остаётся сохранной. Для этого клеточный осадок суспендировали в TES-буфере и оставляли в ледяной бане на 30 минут. Затем добавляли раствор осмотического шока, тщательно перемешивали, после чего оставляли суспензии в ледяной бане. По истечении 30-60 минут центрифугировали клетки в течение 20-30 минут при 12000 g. Отбирали супернатант, содержащий периплазматический экстракт, к которому добавляли NaCl до конечной концентрации 0,5М. Для наработки однодоменных антител в аналитических количествах 20 мкл бактериальной суспензии

пересевали в планшет, содержащий по 400 мкл среды 2xYT и 100 мкг ампициллина в лунке, растили бактериальные клетки до  $OD_{600} \sim 0,6$  в термостатической качалке при  $37^{\circ}C$ . Затем добавляли в каждую лунку 0,1 М ИПТГ и инкубировали в течение 16-18 часов в термостате при  $30^{\circ}C$  с перемешиванием. Затем клетки осаждали центрифугированием (30 минут, 4500 g). В случае использования экстрактов для последующего ИФА добавляли NaCl до конечной концентрации 0,3М.

Очистку наработанных однодоменных антител проводили путём аффинной хроматографии с использованием Ni-NTA агарозы (His-Select Nickel Affinity Gel, Sigma-Aldrich, США), следуя протоколу производителя. Оценку качества и количества белка, содержащегося в полученном элюате, проводили при помощи анализа аликвот в геле-электрофорезе по стандартной методике Лэммли [Laemmli U.K., 1970].

**Получение новых иммуносорбентов на основе отобранных однодоменных наноантител.** Иммуобилизацию белков проводили согласно протоколу производителя с небольшими модификациями. Лиофилизованную CNBr-активированную Сефарозу 4В (GE Healthcare Life Sciences, США) промывали в 1 мМ HCl, из расчёта 200 мл 1 мМ HCl на грамм порошка. Количество используемой агарозы рассчитывалось индивидуально для каждого получаемого иммуносорбента. К активированной агарозе добавляли однодоменное антитело в буфере для связывания (coupling-буфер) из расчёта 1 мг антитела на 1 мл сорбента. Реакцию проводили в 2-мл или 15-мл пробирках, в зависимости от объёма реакционной смеси. Содержимое пробирок перемешивалось с использованием медицинского ротационного смесителя (ELMI Rotamix RM-1, Латвия) в течение двух часов при комнатной температуре. Затем реакцию пришивки останавливали добавлением 1М Tris-HCl, pH 8.0 до конечной концентрации 0,1М, после чего перемешивали на медицинском ротационном смесителе 1-2 часа при комнатной температуре. Как правило, пробирки оставляли на 16-18 часов при  $(+4^{\circ}C)$ , после чего отбирали водную фазу, содержащую несвязавшиеся антитела. Сефарозу с иммобилизованными антителами последовательно промывали растворами с низким и высоким значениями pH: 0,1М ацетатом натрия, pH 4.0, содержащим 0,5М NaCl и 0,1М Tris-HCl, pH 8.0, содержащим 0,5М NaCl. Последовательную промывку двумя растворами проводили три раза, из расчёта 5 объёмов буфера на 1 объём колонки. Полученные иммуносорбенты хранили в солевом буфере PBS, с добавлением азида натрия в рабочей концентрации при  $+4^{\circ}C$ . Перед каждым использованием колонку промывали 3-5 объёмами PBS.

Плазму крови здорового донора, разведённую в 4-10 раз, пропускали через индивидуальный иммуносорбент. Исходное количество анализируемой плазмы рассчитывалось индивидуально для каждого иммуносорбента, и, как правило, составляло объём, равный объёму колонки. Колонку, связавшую антиген, подробно промывали 10-ю объёмами солевого буфера PBS. Элюцию связавшегося белка проводили буфером при пониженном pH, что позволяло разрушить комплекс антиген/антитело, но переменный домен при этом оставался на колонке. Для элюции использовали буфер глицин-HCl, pH 2.7, конечный объём элюата составлял 3 объёма

колонки. Реакцию нейтрализации проводили путём добавления к элюату раствора 1M Tris. Элюированная фракция анализировалась электрофоретически в градиентном полиакриламидном геле (5-19%), после чего обогащающийся белок вырезался для последующей масс-спектрометрической идентификации.

Идентификацию белков после их протеолиза в геле проводили посредством времяпролетной лазерной десорбции-ионизации (MALDI-TOF) и использования системы Mascot для анализа данных о массах получаемых пептидов. Эту работу проводили в центре коллективного пользования «Протеом человека» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ) [Горайнова О.С. с соавт., 2017].

#### ***Иммуноферментный анализ для детекции белка лактоферрина.***

Иммуноферментный анализ в «сэндвич»-формате проводили, как описано ранее [Tillib S.V. et al., 2014] с небольшими модификациями [Горайнова О.С. с соавт., 2019]. Иммунизацию растворенного в 100 мкл PBS наноантитела LF6 (2 мкг/мл) осуществляли в лунках иммунологического планшета (NuncMaxisorp, Thermo Fisher Scientific, США) при +4°C в течение ночи. После 3-х-кратной промывки в PBS проводили блокировку лунок в течение 2 часов в 5%-ной сыворотке верблюда (которая была получена нами перед началом иммунизации животного) в 1%-ном казеиновом буфере для блокировки (Sigma Aldrich, США). После 3-х-кратной промывки в PBS в лунки добавляли препараты разбавленной плазмы и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании. Затем проводили 3-х-кратную промывку в PBS с добавлением 0.05% Tween-20 (PBT). Затем добавляли 100 нг/мл биотинилированного вторичного наноантитела LF5, растворённого в казеиновом буфере для блокировки. Реакцию биотинилирования проводили с помощью препарата Biotin-XX (Sigma Aldrich, США) согласно протоколу фирмы. Лунки инкубировали в течение часа при комнатной температуре. После 3-х-кратной промывки в PBT добавляли 100 нг/мл конъюгата стрептавидина и пероксидазы хрена (Calbiochem, США) в казеиновом буфере для блокировки и инкубировали в течение 1 часа. Проводили 3-х-кратную промывку в PBT, затем в PBS (2 смены). Активность пероксидазы определяли, используя ABTS (Sigma) в качестве хромогенного субстрата. Уровень сигнала измеряли при длине волны 405 нм с помощью микропланшетного фотометра Microplate Reader Multiscan EX (Labsystems, США) [Горайнова О.С. с соавт., 2019].

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Разработана и проведена процедура последовательного поэтапного генерирования однодоменных антител к различным высокопредставленным белкам плазмы крови.
2. Впервые получены и охарактеризованы новые однодоменные антитела, специфически связывающиеся с рядом высокопредставленных белков плазмы крови: сывороточным альбумином, IgG, IgA, IgM, фибриногеном, альфа-2-макроглобулином, трансферрином. Показана эффективность детекции названных

мажорных белков крови с использованием полученных однодоменных антител методами твердофазного иммуноферментного анализа, иммуноаффинной хроматографии. На основе отобранных однодоменных антител получены и функционально охарактеризованы высокоспецифические иммуноаффинные сорбенты.

3. Продемонстрирована высокая эффективность и специфичность работы полученных иммуносорбентов для предобработки препаратов крови (специфического удаления или выделения соответствующих мажорных белков и связанных с ними молекул). На примере иммуноферментной детекции в препаратах крови белка лактоферрина продемонстрирована возможность снижения неспецифического фона путем иммуноаффинной предобработки (специфического истощения) препаратов крови с помощью полученных иммуносорбентов.

#### **Личный вклад соискателя**

Соискатель принимал непосредственное участие в планировании целей и задач исследования, подготовке и проведении экспериментов, анализе полученных результатов, подготовке публикаций и докладов на конференциях.

#### **Степень достоверности и апробация результатов**

Для решения поставленных задач в работе использовались современные инструментальные методы. Обсуждение результатов проведено с учетом современных данных медицинской и биологической науки. Научные положения и выводы, изложенные в диссертации, обоснованы и подтверждены фактическим экспериментальным материалом. Основные материалы диссертационной работы опубликованы в 4 научных статьях, доложены на 19-ой Международной Пушкинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2015), на 20-ой Международной Пушкинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2016).

Диссертационная работа апробирована на межлабораторном семинаре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН) — протокол №1 от 18 июня 2020 г.

#### **Публикации по материалам работы**

По материалам диссертации опубликовано 8 научных работ, из них 4 статьи в журналах, индексируемых в базе данных Scopus, в том числе 3 работы в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, 4 тезисов научных конференций, а также оформлено 2 патента.

#### **Структура и объём диссертации**

Данная диссертационная работа изложена на 167 страницах, содержит 22 рисунка и 3 таблицы. Диссертационная работа состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов, заключение, выводы, практические рекомендации, внедрение результатов в практику, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и список литературы. Список

литературы включает в себя 176 источников: 10 отечественных источников, 166 работ иностранных авторов.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **1. Последовательный многостадийный отбор клонов однодоменных антител к наиболее представленным и иммуногенным белкам плазмы крови**

Селекцию проводили методом модифицированного фагового дисплея [Тиллиб С.В. с соавт., 2010]. Вначале отбирали те клоны наноантител, которые узнавали наиболее представленные и иммуногенные белки. Для увеличения вероятности отбора менее представленных белков с более низкой иммуногенностью полученные наноантитела использовали для преабсорбции, блокировки и конкуренции при повторных селекциях [Горайнова О.С. с соавт., 2017].

В качестве начального антигенного материала для селекции параллельно использовали препараты плазмы крови человека, полученные путем последовательных преципитаций увеличивающимися концентрациями сульфата аммония (сначала 35%, затем 45%), как описано ранее [Page M. et al., 2002]. В супернатанте, полученном в результате этих преципитаций, остается основная часть сывороточного альбумина, а IgG переходит в осадок. Этот антигенный материал использовался для селекции фаговых частиц с экспонированными на поверхности однодоменными антителами [Горайнова О.С. с соавт., 2017]. Также в качестве антигенного материала использовались коммерческие препараты иммуноглобулинов человека IgA, IgG и IgM (ИМТЕК, Россия).

Проводилось три раунда селекции. После финального раунда, с целью отбора наиболее специфичных и высокоафинных антител, осуществлялся последовательный анализ индивидуальных клонов. В результате первого этапа селекции было отобрано и проанализировано 80 клонов, кодирующих последовательности однодоменных антител. Анализ проводили методом NMR-фингерпринтирования индивидуальных клонов [Тиллиб С.В. с соавт., 2010], (рисунок 1).

На основании схожести фингерпринтов клоны делили на группы: из 11 полученных групп две группы объединяли наибольшее число клонов: 56 (70%) и 11 (13.75%) из 80. Оставшиеся клоны представляли собой две малочисленные группы и единичные клоны. Из каждой группы отбирали по 1–2 представителя с целью первичного анализа активности и специфичности отобранных клонов в иммуноферментном анализе. Для этого в небольших (аналитических) количествах нарабатывали в периплазме бактерий соответствующие наноантитела. В качестве вторичных антител использовались конъюгированные с пероксидазой моноклональные мышинные антитела к НА-тэгу, а в качестве антигена — разведённые в PBS препараты плазмы крови человека. В случае эффективного связывания наноантитела с белками плазмы крови, появлялся интенсивный, явно детектируемый сигнал. Такие клоны отбирали для дальнейших исследований.

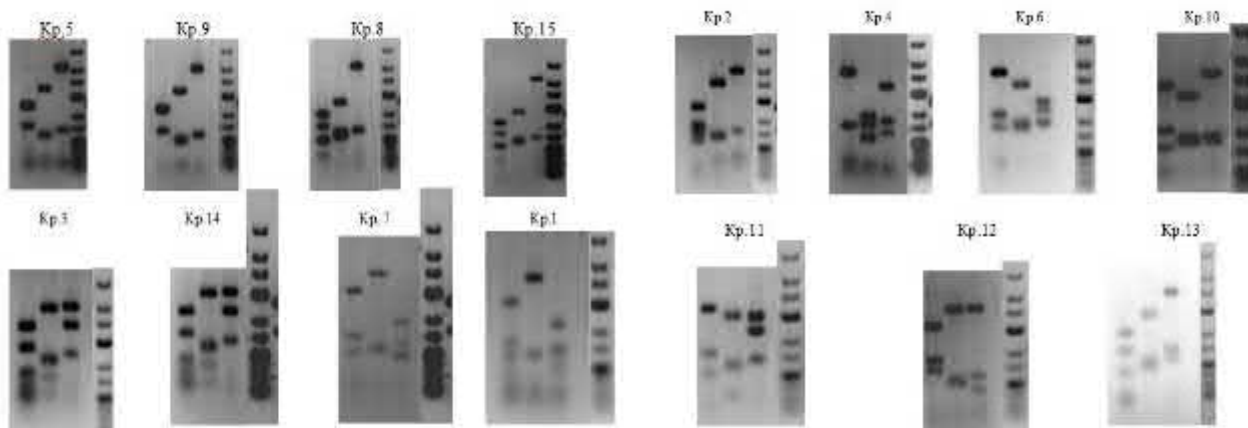


Рисунок 1 – Результаты HMR-фингерпринтного анализа отбираемых после первой селекции клонов наноантител к мажорным белкам крови. Каждый фингерпринт – это электрофореграмма, полученная в результате горизонтального электрофореза в 2,5% агарозном геле фрагментов ДНК, обработанных частощепающими эндонуклеазами *Hinf*I (H), *Msp*I (M) или *Rsa*I (R) (три дорожки слева-направо соответственно). В четвертой дорожке представлена маркерная ДНК. Клоны Kp5 и Kp9, так же как и клоны Kp8 и Kp15, являются представителями наиболее многочисленных по фингерпринту групп вариантов наноантител (70% и 13,75%, соответственно). Kp3 и Kp14 являются представителями малочисленных групп, а остальные варианты представляют собой клоны с индивидуальным фингерпринтом. Маркер – GeneRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Fischer Scientific, США).

## 2. Получение продуцентов адаптированных однодоменных антител и первичный анализ нарабатываемых однодоменных антител

В результате проведенного иммуноферментного анализа были отобраны первые восемь уникальных клонов наноантител. Последовательности этих антител переклонировались в плазмидный вектор pHEN6, который добавляет к С-концу экспрессируемого в периплазме бактерии наноантитела последовательность 6xHis-тэга. Полученным вектором, несущим в себе последовательность антитела, трансформировался штамм *E.coli* XL1. Препарат VHH получали приготовлением ночной культуры бактерий, которую индуцировали для экспрессии белкового продукта (рисунок 2).



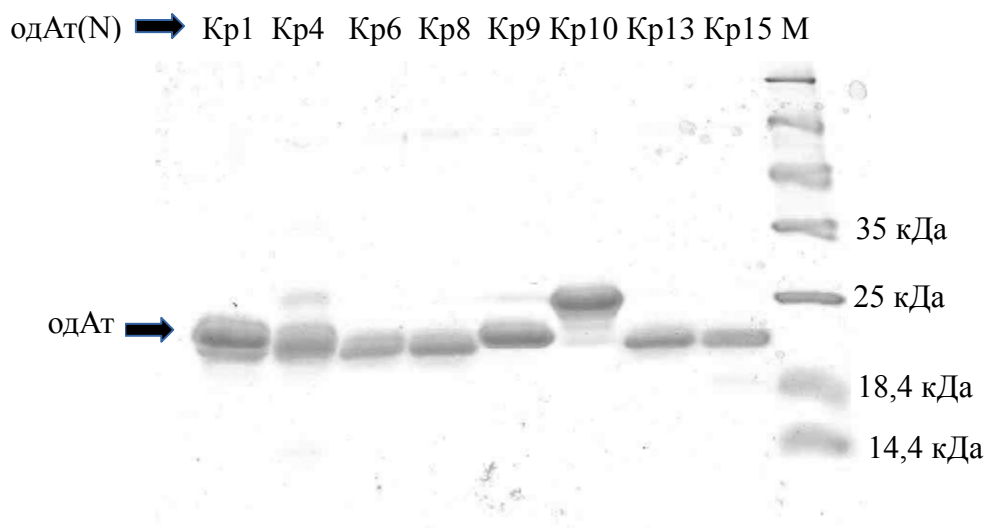


Рисунок 2 – Анализ качества и количества наработанных форматированных однодоменных антител, узнающих белки плазмы крови человека, методом электрофореза в 14% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Экспрессию белка проводили путем добавления 1мМ ИПТГ к бактериальной культуре, инкубацию клеток проводили при 28°C в течение 16-18 часов. ОдАт — однодоменное антитело, М — смесь маркерных белков (Unstained Protein Molecular Weight Marker Thermo Fisher Scientific, США).

### 3. Получение иммуносорбентов на основе однодоменных антител и их использование для специфического связывания/выделения целевых белков крови для их идентификации

С целью идентификации распознаваемых отобранными наноантителами мишеней, каждое индивидуальное наноантитело иммобилизовывали на CNBr-активированной Сефарозе 4В (GE Healthcare Life Sciences) согласно протоколу производителя. Разведённую в 4-10 раз плазму крови пропускали через полученные колонки, связавшиеся белки элюировали раствором с пониженным рН. Идентификацию белков после их протеолиза в геле проводили посредством времяпролетной лазерной десорбции-ионизации (MALDI-TOF) и использования системы Mascot для анализа данных о массах получаемых пептидов [Горяйнова О.С. с соавт., 2017].

Пять из восьми проанализированных антител узнавали наиболее мажорный белок плазмы крови – сывороточный альбумин. Один вариант антитела узнавал IgA. Еще два варианта антител не связывали в данном эксперименте какой-либо белок, вероятно, из-за низкой аффинности. Антитело Кр9, которое, исходя из электрофореграммы, максимально эффективно связывает сывороточный альбумин, является представителем наиболее мажорной фингерпринтной группы отобранных антител (70% всех клонов). Наноантитело Кр8, второе по эффективности связывания – представитель второй мажорной группы (13.75%). Другие наноантитела — представители минорных групп и единичных вариантов клонов из первых 80 (рисунок 3).

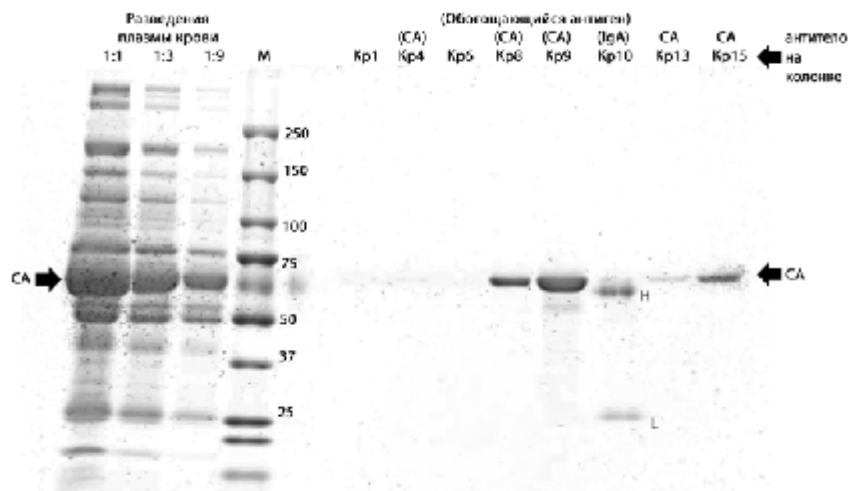


Рисунок 3 – Анализ связывания восьми первых отобранных наноантител (подписаны как Kp1–Kp15) в 5-19% геле в восстанавливающих условиях. Слева нанесена плазма крови человека в трёх разведениях и смесь маркерных белков (Precision Plus Protein Dual Color Standarts, BioRad, США). СА — сывороточный альбумин, IgA – иммуноглобулин А.

С целью отбора наноантитела к менее представленным и менее иммуногенным белкам плазмы полученные однодоменные антитела использовались для преадсорбции, блокировки и конкуренции при дальнейших селекциях методом фагового дисплея новых клонов наноантител из той же библиотеки VHH-последовательностей. Препарат плазмы крови, пропущенный через полученные иммуносорбенты, и, соответственно, истощённый от сывороточного альбумина и IgA, а также коммерческие препараты IgG, IgM, IgA, использовались как антигенный материал для новой селекции. Собственно антигены, альбумин и иммуноглобулины, также использовались для преадсорбции библиотек, конкуренции и «предэлюции» в ходе новых селекций.

Здесь также проводилось три цикла селекции. Отобранными частицами заражали клетки бактерий *E.coli*, штамм TG1. Заражённые клетки высевали на чашки Петри и часть из выросших колоний (48 клонов) подвергали анализу, описанному выше: получение фингерпринтов и группировка соответствующих вариантов, проверка аффинности клонов в ИФА, наработка отобранных антител в периплазме бактерий и их иммобилизация на BrCN-сефарозе. В результате фингерпринтного анализа нами было отобрано 19 клонов. Из 48 клонов, которые отбирались на плазму крови, очищенную от альбумина и IgA, удалось получить по 1 варианту, кодирующему наноантитело против одного из следующих белков плазмы: IgM, фибриногена, альфа-2-макроглобулина ( $\alpha 2M$ ). Данные белки также являются мажорными белками плазмы крови. При этом остальные клоны, несмотря на предварительную очистку, кодировали наноантитела против сывороточного альбумина. Использование коммерческих препаратов аффинно очищенных иммуноглобулинов привело к более корректным, ожидаемым результатам.

Для диссоциации и последующей отмывки фаговых частиц, неспецифически связавшихся с антигеном, проводился процесс «предэлюции». Например, инкубация фагов с сывороточным альбумином и их последующая отмывка позволяла избавиться

от фагов, несущих на поверхности однодоменные антитела к сывороточному альбумину, антитела к которому уже были получены на предыдущем этапе работы. Инкубация со смесью других иммуноглобулинов (например, для селекции наноантител к IgG «предэлюцию» проводили смесью IgA и IgM) позволяла отобрать фаги, несущие на поверхности специфические однодоменные антитела к заданному антигену. В результате удалось отобрать несколько клонов наноантител к каждому классу иммуноглобулинов. В каждой из трех параллельных селекций примерно половина клонов из 48 отобранных узнавала именно данный класс иммуноглобулина. Последующие фингерпринтный анализ и секвенирование показали, что нам удалось отобрать и получить панели различных однодоменных антител, узнающих три класса иммуноглобулинов: 6 различных VHH, узнающих иммуноглобулин G, 4 клон, узнающих иммуноглобулин A и 7 вариантов, узнающих иммуноглобулин M.

Благодаря проведённым конкурентным селекциям удалось отобрать клоны, кодирующие последовательности наноантител, которые способны распознавать и связывать следующие высокопредставленные белки плазмы крови: альбумин, IgG, IgA, IgM, фибриноген, альфа-2-макроглобулин (рисунок 4).

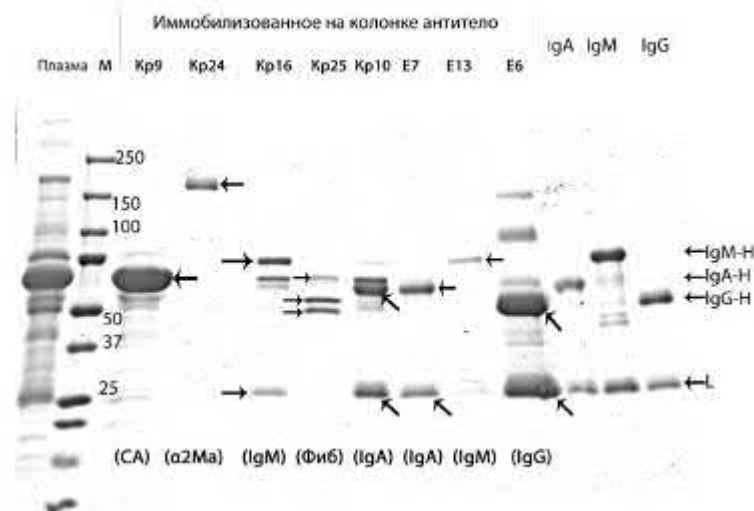


Рисунок 4 – Анализ связывания отобранными в ходе проведённых селекций и иммобилизованными на BrCN сефарозе наноантителами шести различных высокопредставленных белков плазмы крови методом электрофореза в 5-19% полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях. Слева нанесена плазма крови человека и смесь маркерных белков (Precision Plus Protein Dual Color Standarts, BioRad, США). Подписи в скобках обозначают антиген, с которым связывается иммобилизованное однодоменное антитело: CA — сывороточный альбумин, α2Ma — α2-макроглобулин, IgM – иммуноглобулин M, Фиб — фибриноген, IgA – иммуноглобулин A, IgG – иммуноглобулин G. Справа в качестве маркеров нанесены коммерческие препараты иммуноглобулинов A, M и G. При проведении электрофореза в восстанавливающих условиях иммуноглобулины разделяются на два типа цепей, тяжелые (H) и легкие (L), в то время как фибриноген размером 340 кДа распадается на полосы трех размеров: 67 кДа, 56 кДа и 47 кДа.

#### 4. Использование полученных иммуносорбентов для специфического истощения плазмы или сыворотки крови человека

С целью получения плазмы крови человека, истощённой от высокопредставленных белков, к которым нами уже были отобраны наноантитела,

разведённую в 10 раз в Na-фосфатном буфере, pH 7.1 свежеприготовленную плазму крови последовательно пропускали через колонки Affi-Gel Blue-Gel (Bio-Rad, США), связывающие альбумин, Protein G Sepharose (ИМТЕК, Россия), связывающую IgG и четыре иммуносорбента с полученными наноантителами к иммуноглобулинам А и М, фибриногену и  $\alpha 2$ -макроглобулину. На каждой колонке объёмом 1,5 мл было иммобилизовано 1,5 мг наноантитела. В каждом случае собирали фракцию «проскока» суммарным объёмом 2 мл. Полученный материал разделили на 6 частей, 5 из которых использовали для следующей поэтапной иммунизации уже другого верблюда (аналогично описанной выше схеме), а 1 часть оставили для проведения последующих поэтапных селекций (рисунок 5а). После иммунизации, клонирования и проведения трех стадий селекции нами было проанализировано 72 клон, из которых 17 кодировали наноантитела, демонстрирующие в ИФА высокую специфичность связывания с антигенами, содержащимися в материале иммобилизованной истощённой плазмы №2.

Проведение фингерпринтного анализа позволило выявить мажорные группы наноантител (9 из 17), оставшиеся 5 из 17 отобранных клонов обладали индивидуальным паттерном рестрикции. Было установлено, что часть из полученных наноантител связывают трансферрин из плазмы крови человека (рисунок 5б).

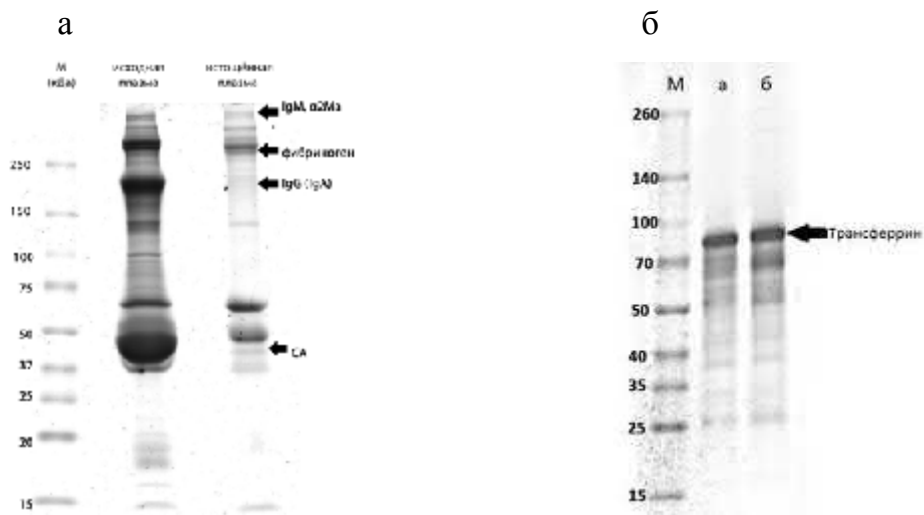


Рисунок 5 – Результаты специфического истощения плазмы крови и анализ связывания содержащихся в ней белков клонами наноантител, отобранными в ходе последующих проведённых селекций. (а): сравнительный анализ методом электрофореза в 5-19% полиакриламидном геле в невосстанавливающих условиях белкового состава исходной плазмы крови человека и специфически истощенной плазмы крови. М – смесь маркерных белков (Precision Plus Protein Dual Color Standarts, «BioRad», США) Стрелками указаны местоположения истощённых/удалённых белков. (б): электрофоретический анализ в 5-19% полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях белков плазмы крови, специфически связавшихся с иммобилизованными на сефарозе однодоменными антителами. Связавшиеся белки в выявленных образцах ((а) и (б)) идентифицированы как трансферрин. М – смесь маркерных белков Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США).

## **5. Исследование возможностей повышения эффективности диагностических анализов маркерных белков крови с помощью предобработки препаратов крови с помощью полученных иммуносорбентов**

С целью изучения эффективности предобработки крови для детекции диагностически важных белков нами разработан следующий подход – предварительное специфическое истощение препаратов сыворотки или плазмы от заданных мажорных белков: либо от сывороточного альбумина, либо от иммуноглобулинов, либо от фибриногена, либо от  $\alpha$ 2-макроглобулина, либо от трансферрина, поскольку многие из этих высокопредставленных белков могут служить причиной появления неспецифического фона и интерференций (помех) при проведении лабораторных тестирований, в частности, ИФА. В рамках данной работы проверялась эффективность предобработки плазмы крови от высокопредставленных белков для детекции в полученных образцах таких диагностически важных маркеров как лактоферрин (ЛФ) и карциноэмбриональный антиген (КЭА) [Горайнова О.С. с соавт., 2019]. В экспериментах использовались препараты здоровых доноров и пациентов, предоставленные Медицинским радиологическим научным центром им. А.Ф. Цыба – филиалом ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России.

Лактоферрин — это железосвязывающий гликопротеин из семейства трансферринов, который присутствует во многих жидкостях организма. В норме его концентрация в крови составляет примерно 1 мкг/мл. ЛФ связывает железо и посредством этого взаимодействует с молекулярными и клеточными компонентами как макроорганизма, так и патогенных микроорганизмов. Данный белок обладает противомикробной, противоопухолевой и противовоспалительной активностью и может выступать в качестве биомаркера аллергических и онкологических заболеваний [Damiens E. et al., 1998; Choi G.S. et al., 2010]. Несмотря на неширокое использование ЛФ в качестве диагностического биомаркера, диагностический и терапевтический потенциал этого белка высок. В связи с этим ЛФ был выбран нами в качестве модельного белка для демонстрации эффективности предочистки плазмы крови от некоторых высокопредставленных, способствующих возникновению фоновых показателей, белков и повышения чувствительности детекции заданного белка при выполнении диагностического иммуноферментного анализа.

Препараты плазмы здоровых доноров, разведённые в 40 раз, последовательно пропускали через 6 разных колонок с иммобилизованными на ВrCN-сефарозе наноантителами к сывороточному альбумину, IgG, IgM, IgA, фибриногену или  $\alpha$ 2-макроглобулину соответственно. Полученные препараты анализировались в сэндвич-ИФА на предмет детекции лактоферрина. Также в каждом случае проводилось дополнительное удаление детектируемого антигена (ЛФ), в результате чего анализировались препараты как до, так и после удаления ЛФ.

Достоверная детекция ЛФ методом ИФА в необработанном (исходном) препарате плазмы крови не представляется возможной. Сохранение данного белка в плазме крови или его удаление из исследуемого образца практически не меняет уровень

детектируемых сигналов в этих препаратах. Удаление сывороточного альбумина, IgA и IgM также не обеспечивает значительного повышения чувствительности ИФА. При этом удаление IgG, фибриногена и  $\alpha$ 2-макроглобулина обеспечивает снижение неспецифического фона при детекции ЛФ (рисунок 6).

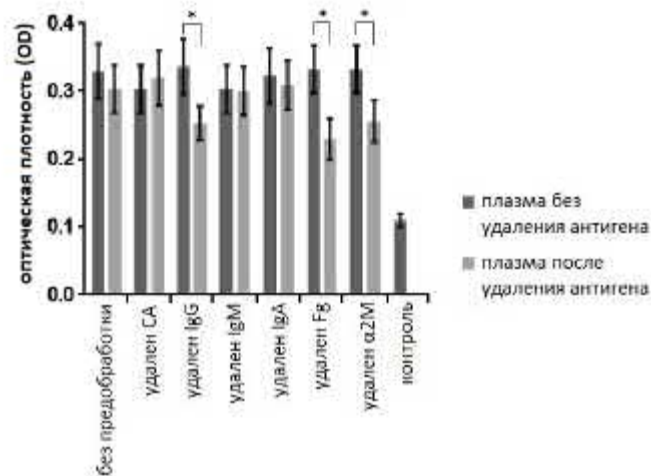


Рисунок 6 – Проверка снижения неспецифического фона (в результате истощения плазмы от заданного высокопредставленного белка) при детекции лактоферрина в разведённой 1:40 плазме крови человека методом иммуноферментного анализа. Анализу подвергались исходные необработанные препараты и шесть препаратов с удалением какого-либо из перечисленных мажорных белков: сывороточный альбумин (CA), IgG, IgM, IgA, фибриноген (Fg) или альфа-2-макроглобулин ( $\alpha$ 2M). Анализировались препараты, в которых в результате предасорбции плазмы крови в лунке с иммобилизованным наноантителом LF6, связывающим лактоферрин, детектируемый антиген как удалялся (светлый столбец), так и не удалялся (тёмный столбец). В контрольную лунку не добавлялся антиген (плазма крови), при этом она блокировалась и подвергалась дальнейшим стадиям анализа параллельно с экспериментальными образцами. Эксперименты выполнены в трёх повторах, приведены усредненные результаты. Диапазон разброса получаемых результатов показан в виде средних значений  $\pm$  SD. Статистическую достоверность отличий определяли по двухвыборочному t-критерию. \* – различия достоверны при  $p < 0,05$  (пакет программ GraphPad Prism 6).

Следующей целью являлось получение максимально возможного в данной тест-системе снижения уровня неспецифического сигнала. 20 мкл периферической плазмы крови двух здоровых доноров разводили в 20 раз в стандартном солевом буфере PBS. Разбавленную плазму в объёме 400 мкл последовательно пропускали через три иммуносорбента с иммобилизованными наноантителами к IgG, фибриногену и  $\alpha$ 2-макроглобулину. Объем каждой из трёх колонок с иммобилизованными в количестве 0,25 мг наноантителами составлял примерно 0,15 мл (1,7 мг наноантитела на мл геля). В каждом случае собирали фракции несвязавшегося материала (суммарный объем 900 мкл). Для проверки качества истощённой плазмы методом электрофореза в 5-19%-ном акриламидном градиентном геле на каждом этапе отбирали аликвоты фракций несвязавшегося материала и фракций элюатов. Полученный препарат плазмы, разведённый в 45 раз, использовали для иммуноанализа. Полученные истощённые образцы использовались в последующих ИФА с целью детекции ЛФ. Здесь также

проводилось дополнительное удаление детектируемого антигена (ЛФ), в результате чего анализировались препараты как до, так и после удаления ЛФ.

Одновременное удаление IgG, фибриногена и  $\alpha$ 2-макроглобулина не приводит к потере ЛФ из препарата, соответственно, уровни детектируемых сигналов в них практически не снижаются по сравнению с исходной плазмой крови. При этом при блокировании связывания иммобилизованного наноантитела с исследуемым антигеном (ЛФ) в препаратах, подвергшихся предобработке, значительно снижается фоновый, интерференционный сигнал, в отличие от исходных образцов (рисунок 7а).

Вычитание из полученных сигналов величины не связанного с плазмой крови контроля показывает существенное снижение интерференции (как доли фона от суммарного сигнала, в %), достигнутое благодаря удалению ряда высокопредставленных белков из плазмы крови (рисунок 7б). Это доказывает, что комбинаторное удаление заданных антигенов при помощи полученных иммуносорбентов с иммобилизованными наноантителами является эффективным подходом для предобработки препаратов плазмы или сыворотки крови с целью последующего чувствительного иммуноферментного детектирования диагностически важных белков.

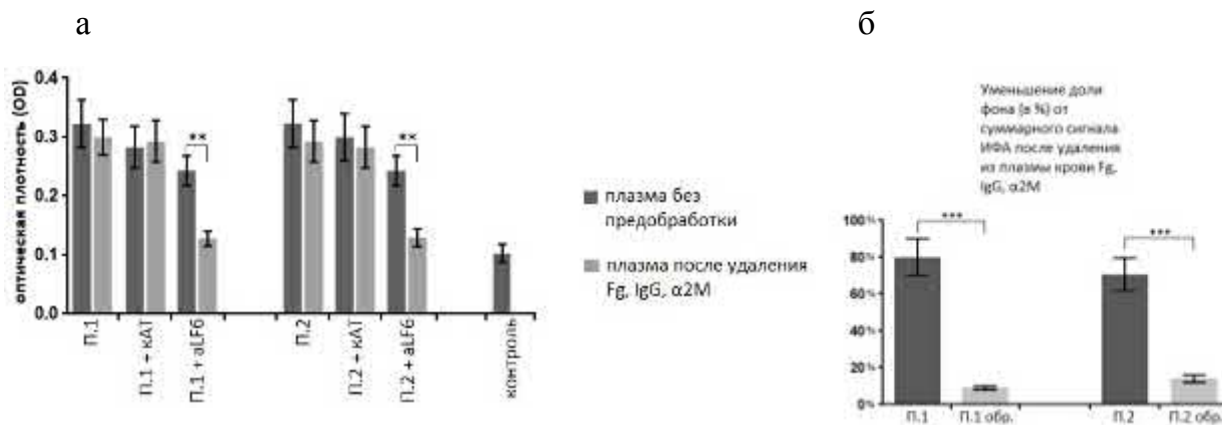


Рисунок 7 – Результаты детекции лактоферрина методом ИФА после суммарного истощения в плазме крови человека иммуноглобулина G (IgG), фибриногена (Fg) и  $\alpha$ 2-макроглобулина ( $\alpha$ 2M). Использовались разведённые в 40 раз препараты плазмы, полученные от двух здоровых доноров, пациентов (П.1 и П.2). **(а)**: анализ исходных препаратов плазмы крови (тёмный столбец) и предобработанных (светлый). С целью идентификации фоновых сигналов примерно за 1 час до постановки анализа к части препаратов плазмы добавляли однодоменные антитела, идентичные иммобилизованным LF6 антителам (П+ $\alpha$ LF6) или контрольные наноантитела, не обладающие специфичностью к лактоферрину (П+кАТ). В контрольную лунку не добавлялся антиген (плазма крови), при этом она блокировалась и подвергалась дальнейшим стадиям анализа параллельно с экспериментальными образцами. **(б)**: оценить показатель снижения интерференции в описанном варианте предобработки плазмы крови позволяет вычитание уровня сигнала, не связанного с плазмой крови (сигнал контрольного значения). Эксперименты выполнены в трёх повторах, приведены усредненные результаты. Диапазон разброса получаемых результатов показан в виде средних значений  $\pm$  SD. Статистическую достоверность отличий определяли по двухвыборочному t-критерию. \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001 (пакет программ GraphPad Prism 6).

Критическая проблема, которая может возникнуть при удалении мажорных белков из препаратов сыворотки или плазмы крови — частичная потеря или соудаление диагностически важных биомаркёров. Причинами этого могут быть неспецифические взаимодействия, нахождение целевых биомаркеров в комплексе с удаляемыми мажорными белками. Особенно важную роль такая проблема играет для низкопредставленных белков, чьё содержание в крови исходно невелико и даже незначительные потери которых могут приводить к ложноотрицательным результатам диагностических анализов. В связи с этим нашей задачей явилось проверить, насколько эффективно возможно удалять мажорные белки из плазмы крови, не теряя при этом низкопредставленные белки. В качестве модельного биомаркера нами был выбран карциноэмбриональный антиген (КЭА).

КЭА – белок, который в норме присутствует в крови взрослого человека в крайне небольших количествах (до 5 нг/мл у некурящих, до 10 нг/мл у курильщиков). Концентрация сывороточного КЭА повышается как при ряде онкологических заболеваний, так и при некоторых доброкачественных осложнениях.

Для аналитических экспериментов по истощению плазмы крови и последующей детекции маркерного белка КЭА использовали образец плазмы крови онкологического пациента с диагнозом «рак яичников IV стадии по классификации FIGO». В качестве антикоагулянта использован гепарин (50 ед./мл). Исходный препарат плазмы крови онкологического больного пропускали через иммуносорбенты с иммобилизованными однодоменными антителами к сывороточному альбумину и иммуноглобулинам различных классов. Далее равные количества полученных очищенных препаратов анализировались путём электрофоретического разделения на предмет специфического удаления заданного белка. Затем полученные образцы подвергали иммуноферментному анализу для детекции в них уровня карциноэмбрионального антигена с использованием коммерческого набора реагентов «КЭА-ИФА» (K224; ООО «Хема») (рисунок 8). Анализ проводили в соответствии с рекомендациями производителя.

Результаты последующего проведённого ИФА показали, что удаление всех вышеназванных высокопредставленных белков не приводит к потерям КЭА из препаратов и сохраняет исходное количество данного низкопредставленного белка. Таким образом, показано, что в случае с КЭА использование полученных иммуносорбентов на основе однодоменных антител позволяет проводить удаление заданных мажорных белков плазмы крови без потери целевого низкопредставленного биомаркера (рисунок 8).



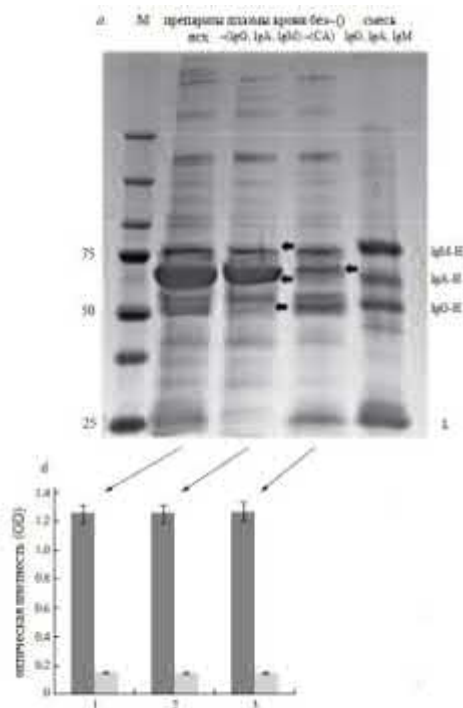


Рисунок 8 – Результаты идентификации методом иммуноферментного анализа количеств КЭА в исходной (исх.) и истощённых от иммуноглобулинов А, G и М (-IgG, IgA, IgM) и сывороточного альбумина (-СА) препаратах плазмы крови. Анализ проводили коммерческим набором реагентов «КЭА-ИФА» (K224; ООО «Хема»). М — смесь маркерных белков (Precision Plus Protein Dual Color Standarts, BioRad, США). Также в качестве маркера нанесены коммерческие иммуноглобулины (смесь IgG, IgA, IgM). Экспериментальные лунки обозначены тёмными столбцами, а светлыми — контрольные лунки с добавлением тех же препаратов плазмы, но истощённых на иммуноаффинных колонках с полученными ранее в нашей лаборатории антителами против КЭА. Эксперименты выполнены в трёх повторах, приведены усредненные результаты. Диапазон разброса получаемых результатов показан.

## 6. Получение однодоменных антител к низкопредставленному маркерному белку крови - цитокину ИЛ-6 человека

Следующей задачей данного исследования явилось получение антител к ряду низкопредставленных белков плазмы крови с целью их использования для специфического обогащения или выделения заданного маркерного белка и ассоциированных с ним молекул. Особый интерес в данном контексте представляют цитокины — сигнальные полипептиды, которые участвуют в межклеточных взаимодействиях в процессе иммунного ответа, а также в регуляции ряда нормальных физиологических функций. Многие цитокины являются маркерами опухолевых процессов, нарушений в работе иммунной системы, вирусных инфекций и других заболеваний. Одной из наиболее диагностически важных молекул семейства цитокинов является интерлейкин 6 (ИЛ-6). В норме содержание ИЛ-6 в плазме крови не должно превышать 7 пг/мл. При этом при некоторых заболеваниях его концентрация может повышаться, например, при раке молочной железы уровни ИЛ-6 в крови могут достигать 55 пг/мл [Bachelot et al., 2003]. Тем не менее, концентрация интерлейкина-6 крайне невысока, как в норме, так и при патологии. В связи с этим очень важным видится создание надёжного инструментария, применение которого позволит удалять

белки, вносящие дополнительный нежелательный фоновый сигнал при детекции этого диагностически важного низкопредставленного маркерного белка (особенно для избежания ложноположительных сигналов, возникновение которых весьма вероятно при таких низких уровнях данного антигена).

На данный момент нами получены и охарактеризованы однодоменные антитела, связывающие ИЛ-6 человека [Тиллиб С.В. с соавт., 2015; патент РФ №2603269]. Определённая новизна в получении этих антител заключается в том, что для этих целей иммунизируемым животным, донором однодоменных антител, выступала лама (*Lama glama*), а не двугорбый верблюд. Как и бактриан, она также относится к семейству Верблюдовых, и, соответственно, является носителем уникальных однодоменных антител. Для генерирования *in vivo* однодоменных антител, специфически узнающих белок ИЛ-6, была проведена пятиэтапная иммунизация ламы (*Lama glama*) путем подкожных инъекций рекомбинантного белка ИЛ-6 человека (0,5 мг), смешанного в равных пропорциях с адьювантом LQ (Gerbu, Германия). Клонирование (выделение РНК из моонуклеарной фракции крови иммунизированной ламы, синтез кДНК, двухстадийная ПЦР со специфическими праймерами, рестрикция и очистка вставок, встраивание полученных вставок в фагмидный вектор, трансформация бактерий) осуществляли так же, как описано ранее. В фагмидный вектор клонировали весь репертуар кДНК-последовательностей антиген распознающих доменов особых антител ламы, используя в качестве матрицы мРНК лимфоцитов периферической крови иммунизированного животного. Для амплификации последовательностей, кодирующих переменные домены однодоменных антител, использовались праймеры, комплементарные именно последовательностям особых антител ламы [Van der Linden R.H. et al., 2014]. Методом фагового дисплея проводили селекцию специфических однодоменных антител, в качестве иммобилизованного в лунках ИФА-планшета антигена использовали рекомбинантный белок ИЛ-6. Все манипуляции проводили, как описано ранее. По результатам фингерпринтного анализа, проведённого аналогично тому, как описывалось выше, отобранные клоны разделяли на группы. Далее активность каждого клона анализировалась с помощью ИФА, и клоны, отобранные на данном этапе, секвенировали с целью идентификации различающихся вариантов для их дальнейшего переклонирования в экспрессионный вектор. В итоге было отобрано три высокоспецифичных однодоменных антитела к ИЛ-6 (рисунок 9).

На основе отобранных однодоменных антител были созданы биспецифические конструкции с целью их испытания на мышинных и клеточных моделях [Мохонов В.В. с соавт., 2015; Тиллиб С.В. с соавт., 2015]. Планируется использование полученных однодоменных антител для исследовательских и диагностических целей.

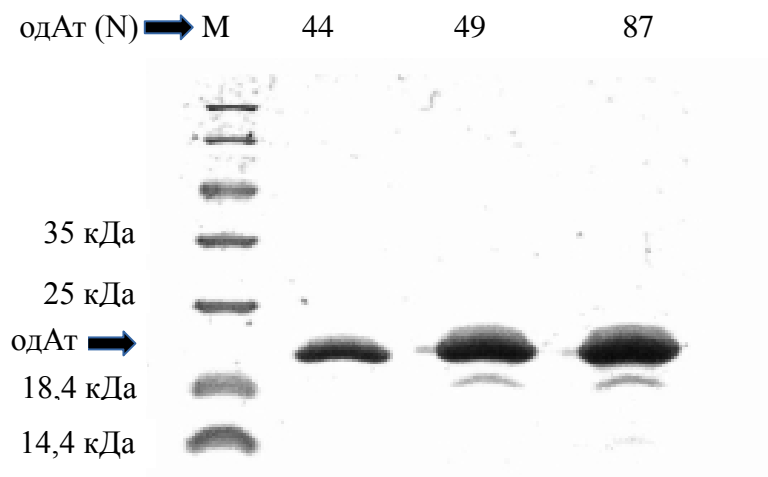


Рисунок 9 – Анализ методом электрофореза в 14%-ном полиакриламидном геле наработанных и очищенных однодоменных антител, специфически узнающих ИЛ-6 человека. М – смесь маркерных белков Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific, США).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данного исследования была разработана методика, направленная на получение и отбор высокоспецифичных рекомбинантных однодоменных антител, связывающих различные белки плазмы крови человека. В качестве антигенов использовалась как периферическая плазма крови человека, так и коммерческие препараты некоторых белков. Было показано, что отобранные панели антител высокоспецифично связывают такие белки крови человека, как сывороточный альбумин, иммуноглобулин А, иммуноглобулин G, иммуноглобулин М, фибриноген,  $\alpha$ 2-макроглобулин, трансферрин. Разработанная процедура генерирования и отбора рекомбинантных антител потенциально может использоваться не только для получения наноантител, узнающих белки плазмы крови, но и для генерирования наноантител к мажорным компонентам других сложных субпротеомов, других биологических жидкостей, при этом получение новых наноантител можно проводить, как описано в разработанном нами методе, и не имея очищенных антигенов из исследуемого субпротеома или жидкости.

На основе отобранных наноантител были созданы иммуносорбенты, высокоспецифично связывающие заданные белки крови. Было показано, что использование полученных иммуносорбентов для предобработки препаратов плазмы крови является важным этапом пробоподготовки с целью использования полученных препаратов для последующего иммуноферментного анализа. Такая пробоподготовка обеспечивает удаление из образца белков, вызывающих фоновые сигналы и интерференции, с сохранением в анализируемом препарате целевого антигена. На примере белка лактоферрина было продемонстрировано, что аффинное удаление с помощью иммобилизованных однодоменных антител некоторых высокопредставленных

белков (фибриногена, иммуноглобулина G и альфа-2-макроглобулина) из препаратов плазмы крови приводит к повышению соотношения суммарного детектируемого сигнала к неспецифическому фону. Также на примере белка КЭА было показано, что использование иммуносорбентов на основе однодоменных антител для удаления ряда наиболее высокопредставленных белков плазмы крови не приводит к потере этого диагностически важного низкопредставленного белка. В дальнейшем планируется проверка актуальности данного тезиса и для других маркерных белков. Образцы плазмы крови разных пациентов обладают собственным, варьирующим протеомным составом и содержат различное количество факторов, влияющих на возникновение интерференций и фоновых помех, что требует подбора индивидуальных условий предобработки для каждого образца. Полученные панели высокоспецифических однодоменных антител к различным высокопредставленным белкам крови и комбинаторное использование созданных на их основе иммуносорбентов обеспечивает возможность специфичной, адаптируемой и недорогой предобработки плазмы крови как для конкретного пациента, так и для конкретного маркерного белка.

## ВЫВОДЫ

1. Разработана и использована новая процедура последовательного поэтапного генерирования и отбора рекомбинантных однодоменных антител (наноантител) к различным высокопредставленным белкам плазмы крови человека, включающая в себя следующие этапы: иммунизация верблюда, клонирование последовательностей антиген-узнающих доменов неканонических антител двугорбого верблюда, последовательный многостадийный отбор антигенспецифичных клонов однодоменных антител, получение продуцентов адаптированных однодоменных антител и первичный анализ нарабатываемых однодоменных антител.
2. Получены новые наноантитела, узнающие различные целевые белки плазмы крови человека, а именно: сывороточный альбумин, иммуноглобулин А, иммуноглобулин G, иммуноглобулин М, фибриноген,  $\alpha$ 2-макроглобулин, трансферрин, интерлейкин-6. Получены последовательности кДНК, кодирующие эти наноантитела, и бактериальные продуценты этих наноантител.
3. На основе полученных однодоменных антител созданы новые иммуносорбенты, демонстрирующие высокую специфичность связывания целевых белков крови: альбумина, иммуноглобулина G, иммуноглобулина А, иммуноглобулина М, фибриногена,  $\alpha$ 2-макроглобулина, трансферрина.
4. Показана возможность использования новых реагентов (наноантител) и их производных (иммуносорбентов) для эффективных специфических предобработок/истощений сыворотки или плазмы крови для специфического обогащения/выделения мажорного или маркерного белка и ассоциированных с ним молекул.

5. Показана возможность использования иммобилизованных наноантител для эффективной предобработки плазмы крови с целью снижения уровня фонового сигнала в последующем иммуноферментном анализе.

#### **Практические рекомендации**

В ходе выполнения данной работы получены рекомбинантные однодоменные антитела, являющиеся надёжным инструментарием для создания на их основе иммуносорбентов, обладающих потенциалом для их использования в различных приложениях. В качестве матрицы для создания подобных иммуносорбентов могут использоваться сефароза, магнитные частицы, мембраны из различных материалов. Полученные в ходе выполнения диссертационной работы данные об эффективности предобработки плазмы крови с помощью иммуносорбентов на основе однодоменных антител могут использоваться для повышения качества клинической лабораторной диагностики, для снижения вероятности ложноположительных и ложноотрицательных результатов при постановке диагностически важных анализов, в частности, иммуноферментного анализа.

#### **Перспективы дальнейшей разработки темы**

Данную диссертационную работу можно считать одним из первых шагов проекта по созданию универсальной системы предобработки плазмы и сыворотки как для образцов крови, полученных от разных пациентов, так и для разнообразных антигенов. В дальнейшем, планируется разработать универсальную систему предобработки плазмы крови для последующего использования такого предобработанного препарата в клинических анализах (в частности, для постановки иммуноферментного анализа полученного образца) с целью получения достоверных результатов. Используя уже полученный в рамках работы над диссертацией инструментарий, в частности, иммуносорбенты на основе иммобилизованных однодоменных антител, специфически связывающих различные белки плазмы крови, в качестве одного из первых дальнейших шагов планируется исследование разных возможностей предобработки плазмы крови для детекции ряда маркерных белков. Предполагается, что создание такой универсальной системы (с использованием в том числе полученных иммуносорбентов) позволит устранять интерферирующие сигналы, возникающие в исследуемых образцах разных пациентов, а также осуществлять параллельный анализ нескольких антигенов в исследуемом препарате. Также планируется проведение исследований, направленных на повышение чувствительности иммуноферментного анализа при детекции различных низкопредставленных белков. Для этой цели предполагается использование полученных в ходе данной диссертационной работы однодоменных антител.

#### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Горяйнова, О.С. Наноантитела как перспективный новый инструмент для повышения эффективности анализа белков плазмы крови / **О.С. Горяйнова**, Т.И. Иванова, С.В. Тиллиб // Сборник тезисов 19 международной Пушинской школы-

- конференции молодых учёных «Биология – наука 21 века». 2015, Пущино. – С. 15.
2. Тиллиб, С.В. Получение и характеристика рекомбинантных однодоменных антител из ламы, специфически связывающихся с интерлейкином-6 человека / С.В. Тиллиб, Г.А. Ефимов, Е.О. Губернаторова, О.С. Горяйнова, Т.И. Иванова, А.А. Бочаров, А.Г. Гончаров, Штефан Розе-Ион, А.А. Круглов, М.С. Друцкая, С.А. Недоспасов // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9, № 18. – С. 400-409.
  3. Мохонов, В.В. Новые биспецифические белки, связывающие цитокины и поверхностные маркеры миелоидных клеток. / В.В. Мохонов, Е.С. Шилов, К.В. Корнеев, К-С. Н. Атретханы., Е.А. Горшкова, А.А. Жданова, Е.А. Василенко, О.С. Горяйнова, Д.В. Купраш, С.В. Тиллиб, М.С. Друцкая, Г.А. Ефимов, С.А. Недоспасов // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 10, № 19. – С. 378-385.
  4. Горяйнова, О.С. Комбинаторное использование создаваемых иммуноафинных колонок для повышения эффективности анализа протеома сыворотки крови человека / О.С. Горяйнова, Т.И. Иванова, С.В. Тиллиб // Сборник тезисов 20 международной Пущинской школы-конференции молодых учёных «Биология – наука 21 века». 2016, Пущино. – С. 220-221.
  5. **Горяйнова, О.С. Метод параллельного и последовательного генерирования однодоменных антител для протеомного анализа плазмы крови человека / О.С. Горяйнова, Т.И. Иванова, М.В. Рутовская, С.В. Тиллиб // Молекулярная биология. – 2017. – Т. 51, № 6. – С. 985-996.**
  6. Тиллиб, С.В. Перспективные направления использования однодоменных антител / С.В. Тиллиб, Т.И. Иванова, О.С. Горяйнова, А.И. Бурлин, Е.О. Хан, Ю.О. Добролюбова // Научные труды Объединённого научного форума, включающего Международную научную конференцию по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» и VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды»: научные труды. 2017, Москва, ИБХ РАН. – С. 46.
  7. **Горяйнова, О.С. Новый метод, базирующийся на использовании иммобилизованных однодоменных антител для удаления определенных мажорных белков из плазмы крови, способствует уменьшению неспецифического сигнала в иммуноанализе / О.С. Горяйнова, Е.О. Хан, Т.И. Иванова, С.В. Тиллиб // Медицинская иммунология. – 2019. – Т. 21, № 23. – С. 567-575.**
  8. Tillib, S.V. Single-Domain Antibodies for Immunosorbent Ligands, Antigen Tracking in vivo Probes and for Antigen Mimicry / S.V. Tillib, O.S. Goryainova, A.I. Burlin, E.O. Khan, T.I. Ivanova // Abstract book: 1st Bonn Nanobody Symposium. 2019, Germany, University of Bonn. – P. 37.

## ПАТЕНТЫ

1. Патент 2599423, Российская Федерация, МПК C07K 16/28 (2006.01), G01N 33/53 (2006.01), A61K 39/395 (2006.01), A61K 47/46 (2006.01). Рекомбинантные однодоменные антитела, специфически связывающие белок F4/80, способ их получения и использования для детекции этого белка. / Тиллиб С.В., Недоспасов С.А., Ефимов Г.А., Розов Ф.Н., Горяйнова О.С., Иванова Т.И., Рутовская М.В. Заявители и патентообладатели: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН) (RU), Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН) (RU). - № 2015131073/10; заявл. 28.07.2015; опубл. 10.10.2016, Бюл. № 28. -19с.
2. Патент 2603269, Российская Федерация, МПК C07K 16/24 (2006.01), C12N 15/13 (2006.01). Рекомбинантные однодоменные антитела, специфически связывающие интерлейкин-6 человека, способ их получения и использования для детекции этого белка / Тиллиб С.В., Недоспасов С.А., Ефимов Г.А., Друцкая М.С., Круглов А.А., Горяйнова О.С., Иванова Т.И. Заявители и патентообладатели: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН) (RU). - № 2015145831/10; заявл. 26.10.2015; опубл. 27.11.2016, Бюл. № 33. -15с.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

$\alpha$ 2M — альфа-2-макроглобулин  
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота  
ИФА — иммуноферментный анализ  
ИЛ — интерлейкин  
кДНК — комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота  
КЭА — карциноэмбриональный антиген  
ЛФ — лактоферрин  
одАт — однодоменное антитело  
поли(А)РНК — полиаденилированная рибонуклеиновая кислота  
ПЦР — полимеразная цепная реакция  
РНК — рибонуклеиновая кислота  
СА — сывороточный альбумин  
ABTS — 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат)  
CDR — гипервариабельный участок  
СН — константный домен тяжёлой цепи иммуноглобулина  
Ig — иммуноглобулин  
НА — гемагглютинин  
HMR — рестриктазы Hinf, Msp, Rsa  
VH — вариабельный домен тяжёлой цепи иммуноглобулина  
VHH — наноантитело