

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ГЕНА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Горайнова Оксана Сергеевна

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

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Специальность:

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Научный руководитель:
Доктор биологических наук
С. В. Тиллиб

Москва
2021

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	6
Актуальность темы исследования.....	6
Степень разработанности темы исследования.....	8
Цель работы.....	9
Поставленные задачи.....	9
Научная новизна работы.....	10
Теоретическая и практическая значимость работы.....	11
Методология и методы исследования.....	13
Основные положения, выносимые на защиту.....	13
Степень достоверности и апробация результатов.....	14
Публикации по материалам работы.....	15
Личный вклад соискателя.....	15
Структура и объём диссертации.....	15
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1. Однодоменные антитела.....	16
1.1.1. Сравнение классических иммуноглобулинов и однодоменных антител.....	16
1.1.2. Молекулярные особенности однодоменных антител.....	18
1.1.3. Технология получения однодоменных антител.....	19
1.1.4. Свойства VHH.....	23
1.1.5. Возможные области применения VHH.....	27
1.2. Протеом крови.....	34
1.2.1. Методы исследования белков крови.....	34
1.2.2. Высокопредставленные белки плазмы крови.....	39
1.2.3. Низкопредставленные белки плазмы крови и способы их детекции.....	44
1.2.4. Интерференции (фоновые помехи), возникающие при проведении диагностических иммунологических тестов и способы борьбы с ними.....	48
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	56
1. Оборудование.....	56
2. Антитела.....	56
3. Ферменты.....	57

4. Бактериальные среды.....	57
5. Методы, использованные в работе с верблюдом.....	58
5.1. Иммунизация верблюда и получение библиотеки последовательностей наноантител.....	58
6. Работа с фаговыми библиотеками.....	59
6.1. Приготовление компетентных клеток линии E.coli.....	59
6.2. Встраивание генов наноантител в вектор для фагового дисплея. Создание фаг-дисплейных библиотек.....	61
6.3. Амплификация фаговых частиц.....	61
6.4. Селекция библиотеки.....	62
6.5. Полимеразная цепная реакция.....	64
6.6. Фингерпринтный анализ отобранных вариантов однодоменных антител	65
6.7. Минипрепаративное выделение плазмидной ДНК.....	66
6.8. Определение концентрации нуклеиновых кислот.....	67
6.9. Горизонтальный гель-электрофорез.....	67
7. Продукция и очистка рекомбинантных однодоменных антител.....	68
7.1. Получение экспрессионного вектора.....	68
7.2. Трансформация бактериальных клеток.....	69
7.3. Приготовление периплазматического экстракта.....	70
7.4. Очистка белка на Ni-NTA-сефарозе.....	71
7.5. Гель-электрофорез в полиакриламидном геле.....	72
7.6. Осаждение белков.....	73
8. Получение новых иммуносорбентов на основе отобранных однодоменных антител.....	73
8.1. Иммобилизация однодоменных антител на CNBr-активированной Сефарозе 4В.....	73
8.2. Использование полученных иммуносорбентов для специфического связывания/выделения целевых белков крови для их идентификации.....	74
8.3. Идентификация белков методом масс-спектрометрии.....	75
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	76

1. Отработка методики получения специфических клонов однодоменных антител на примере белка F4/80. Использование полученных клонов антител для детекции рекомбинантного белка F4/80.....	76
2. Разработка и применение метода параллельного генерирования и последовательного отбора клонов однодоменных антител к высокопредставленным белкам крови. Использование полученных на основе отобранных наноантител инструментов для специфического истощения плазмы крови человека и анализ диагностического потенциала полученных истощённых препаратов.....	84
2.1. Первая иммунизация верблюда плазмой крови человека.....	84
2.2. Клонирование всего репертуара кДНК-последовательностей антиген-узнающих доменов (однодоменных антител, VHH) неканонических антител иммунизированного двугорбого верблюда.....	85
2.3. Последовательный многостадийный отбор клонов однодоменных антител к наиболее представленным и иммуногенным белкам плазмы крови	85
2.3. Получение продуцентов адаптированных однодоменных антител и первичный анализ нарабатываемых однодоменных антител.....	90
3. Использование полученных однодоменных антител в качестве лигандов для новых иммуносорбентов с целью специфической предобработки (истощения) препаратов крови и для выделения целевых белков (и субпротеомов) крови.	91
3.1. Использование полученных иммуносорбентов для специфического связывания/выделения целевых белков крови для их идентификации.....	91
3.2.Использование полученных иммуносорбентов для специфического истощения плазмы или сыворотки крови человека. Вторая иммунизация верблюда истощённой плазмой крови человека.....	97
3.3. Исследование возможностей повышения эффективности диагностических анализов маркерных белков крови с помощью предобработки препаратов крови с помощью полученных иммуносорбентов	100

3.3.1. Использование полученных иммуносорбентов для специфического удаления некоторых высокопредставленных белков с целью уменьшения неспецифического фонового сигнала и повышения чувствительности при диагностическом иммуноферментном анализе на примере белка-лактоферрина.....	100
3.3.2. Использование полученных иммуносорбентов для специфического удаления некоторых высокопредставленных белков с целью проверки возможного соудаления низкопредставленных белков в последующем иммуноферментном анализе на примере карциноэмбрионального антигена	107
4. Получение однодоменных антител к низкопредставленному маркерному белку крови - цитокину ИЛ-6 человека.....	111
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	116
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	130
ВЫВОДЫ.....	132
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	134
ВНЕДРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ В ПРАКТИКУ.....	134
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	134
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	136
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	139
БЛАГОДАРНОСТИ.....	167

ВВЕДЕНИЕ

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 [102]. Однако, несмотря на такое разнообразие, всего 22 белка составляют 99% тотальной белковой массы крови [125]. К ним относятся альбумин, иммуноглобулины, фибриноген, трансферрин и др. С одной стороны, эти высоко представленные («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

высококочувствительной 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.

Мы предполагаем, 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 вариабельных 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 [4, 8, 14, 65, 108, 154]. 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 гетеродимеризацию/олигомеризацию наноантител, что увеличивает их авидность 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 единичный 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.

Поставленные задачи

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 переменные 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 высокоспецифическое 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 VHH-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.

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.

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 Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2015), на 20-ой

Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 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.

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.

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Однодоменные антитела

1.1.1. Сравнение классических иммуноглобулинов и однодоменных антител

Антитела или иммуноглобулины – это гликопротеины, которые представляют собой мультимерные молекулы, состоящие из двух тяжелых (H) и двух легких (L) цепей. Каждая тяжелая и легкая цепь антител состоит из двух типов доменов: константных (C) и переменных (V). Количество доменов в каждом типе цепей различается: легкая цепь содержит один константный (CL) и один переменный (VL) домены, а тяжелая три константных (CH1, CH2, CH3) и один переменный (VL) домены [119, 124] (рисунок 1). Наиболее часто в биотехнологии используются производные антител, Fab и scFv. Fab представляют собой только антигенсвязывающие фрагменты антител без константных районов, поскольку последние не участвуют в распознавании антигенов, а scFv – фьюжн VH и VL, объединённых линкерным пептидом. Однако получение таких фрагментов антител сопровождается различными техническими трудностями, например, агрегацией и низким уровнем их экспрессии в гетерологичных системах.

Настоящим сюрпризом стало открытие, совершённое бельгийскими исследователями в 1993 году. Выяснилось, что в периферической крови некоторых млекопитающих, а именно представителей семейства Верблюдовые (Camelidae) присутствуют, помимо классических антител, и необычные неканонические антитела [65]. Такое антитело получило название HCAb («heavy chain antibody»), поскольку структурно такая молекула представляет из себя только лишь фрагмент одной тяжелой укороченной цепи, в отсутствие второй тяжелой и обеих легких цепей. Всего один переменный домен VHH (Variable domain of the Heavy chain of the Heavychain antibody) формирует антиген-узнающий участок такого антитела.

Антитела, аналогичные неканоническим антителам Верблюдовых, вскоре были обнаружены в крови некоторых представителей хрящевых рыб, в частности, акул [44]. Особым преимуществом VHH является их размер (длина составляет около 4,2 нм, а диаметр — 2,5 нм), что делает эти молекулы необычайно ценным и удобным инструментом для различных биотехнологических и биомедицинских приложений. Рекомбинантные аналоги (производные) VHH называют «наноантитело», «однодоменное антитело», «нанотело» или «мини-антитело» (рисунок 1).

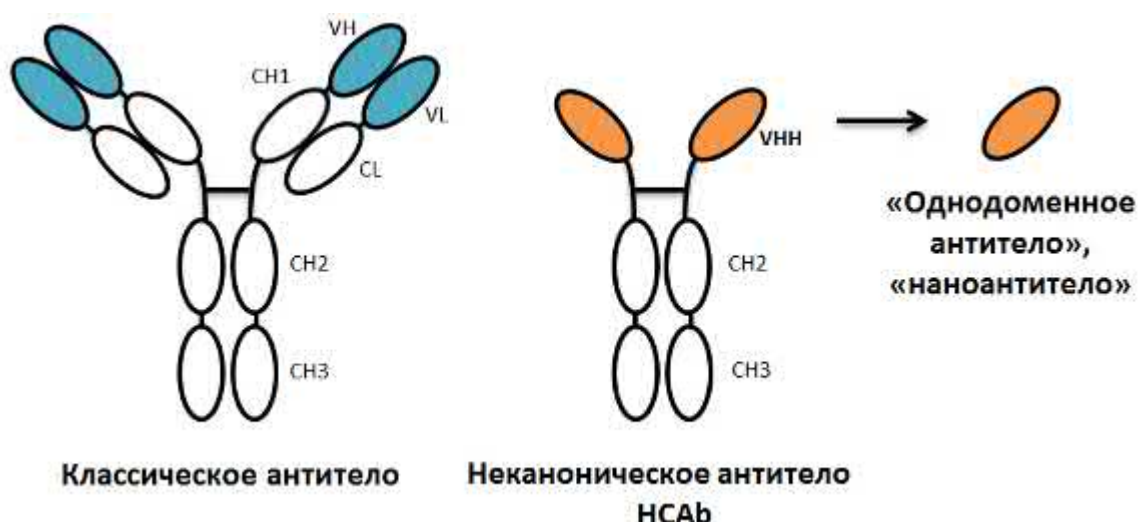


Рисунок 1 – Структура классического и неканонического (HCAb), обнаруженного в крови семейства Верблюдовых, антител. CH – константный домен тяжёлой цепи, VH – переменный домен тяжёлой цепи, CL – константный домен лёгкой цепи, VL – переменный домен лёгкой цепи, VHH – переменный домен особого неканонического антитела. «Однодоменное антитело» или «наноантитело» - рекомбинантный аналог VHH.

Помимо миниатюрных размеров, преимуществом VHH является их вытянутая шаровидная форма. В связи с этим становится очень широк спектр возможных узнаваемых этими белками эпитопов, которые недоступны большинству крупных классических антител. Ещё одним преимуществом, которое делает VHH весьма привлекательным объектом для использования в биомедицинской практике является их способность проникать через гематоэнцефалический барьер, плотные стенки тканей и опухолей [170].

Повышенная стабильность VHH обусловлена их устойчивостью к агрессивным условиям внешней среды (низкие и высокие значения pH, температуры). Количество публикаций, посвящённых использованию VHH, неизменно растёт, что показывает высокую степень интереса к уникальным инструментам, полученным на их основе.

1.1.2. Молекулярные особенности однодоменных антител

Вариабельные домены неканонических антител (VHH) и вариабельные домены (VH) классических антител весьма сходны по строению: и в том, и в другом случае три гипервариабельных участка, определяющих комплементарность, CDR (Complementarity Determining Regions) окружены четырьмя консервативными каркасными участками FR (Framework Regions) [152]. CDR участки играют ключевую роль в распознавании и связывании антигена, поскольку формируют антиген-связывающий сайт. Сравнение последовательностей VH и VHH показало, что последние имеют более длинные CDR по сравнению с таковыми классических антител. Например, средняя длина CDR3 у мыши и человека равна 9 и 12 аминокислотам соответственно [171], тогда как CDR3 дромадера обычно имеют длину 16-18 аминокислот [109, 114]. Увеличение размеров CDR1 и CDR3 у одногорбого верблюда происходит за счёт включения в них дополнительных остатков цистеина, которые образуют дисульфидные связи и тем самым стабилизируют паратоп [34]. Также, за счёт ряда устойчивых аминокислотных замен, VHH является более гидрофильной молекулой по сравнению с VH.

CDR3 Верблюдовых обладает уникальной способностью образовывать длинные пальцеобразные расширения, которые могут проникать в полости на антигенах. Тогда как Fab-фрагменты, полученные из классических моноклональных антител, склонны формировать плоскую или вогнутую поверхность, за счёт чего способны связываться лишь с поверхностью

антигена. По этой причине более частыми мишенями для VHH являются участки молекулы, имеющие вогнутую структуру – например, углубления, формирующие активный сайт ферментов. И, действительно, иммунная система верблюдов обладает свойством образования однодоменных антител, выступающих в роли ингибиторов ферментов [81, 96].

1.1.3. Технология получения однодоменных антител

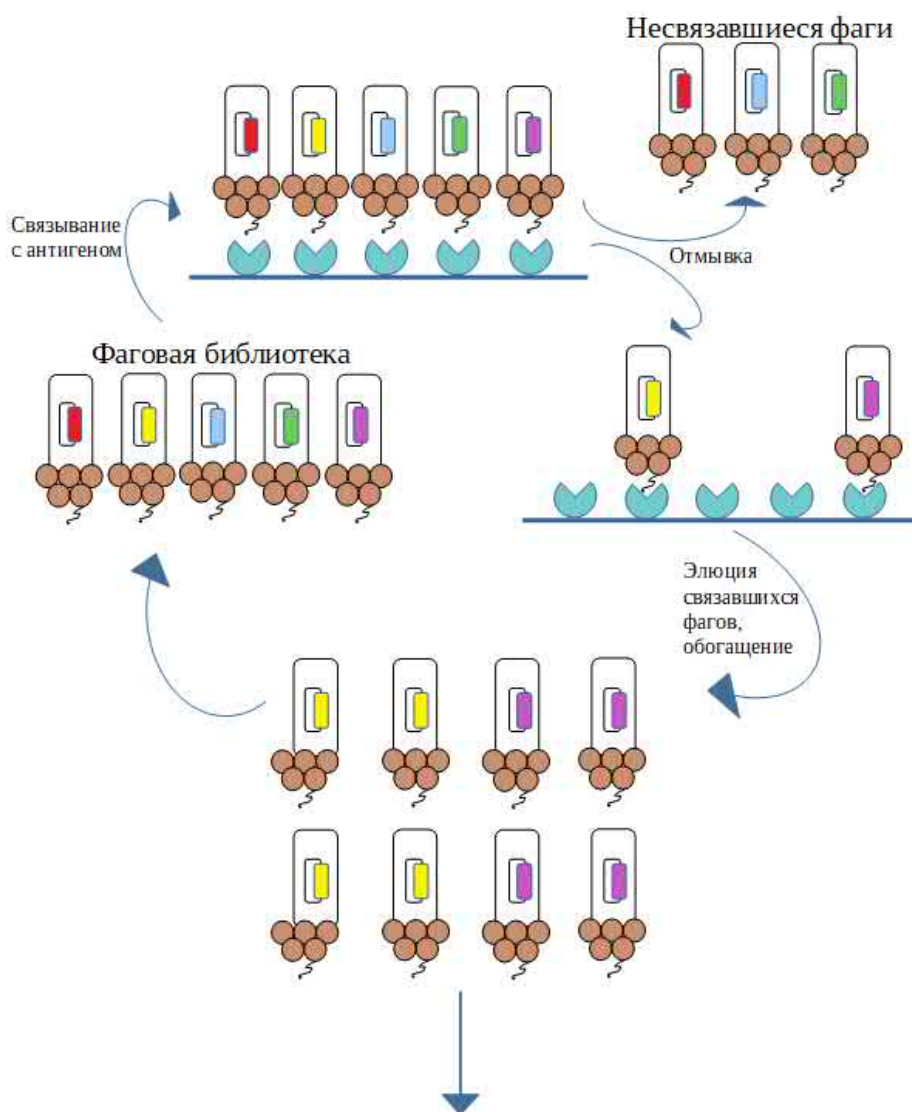
Сыворотка одногорбого верблюда содержит порядка 75% HCAbs, ламы порядка 45% [2]. Индукцию образования антител HCAb к заданным мишеням осуществляют проводя четыре-шесть инъекций суспензией антигена (от 50 до 1000 мкг в зависимости от иммуногенности) с адъювантом представителю сем. Верблюдовых [96]. Количество антигена, требующегося для такой иммунизации, ненамного выше того количества, которое требуется для аналогичной иммунизации более мелких животных, например, кролика. При иммунизации верблюда с использованием ферментов могут образовываться варианты HCAb, которые реагируют с активными центрами ферментов. Такие HCAb, как и их производные – переменные домены, наноантитела, могут быть использованы как эффективные конкурентные ингибиторы [96].

Затем осуществляют клонирование всего репертуара генов наноантител из В-лимфоцитов периферической крови иммунизированного животного. Обычно для этого достаточно 100 мл крови. Проводят ряд последовательных биохимических и молекулярно-биологических процедур: выделения из фракции белых клеток крови полиаденилированных РНК, синтеза кДНК, двухстадийной ПЦР со специфическими праймерами, комплиментарными последовательности, кодирующей шарнирную область HCAbs [8]. Амплифицированный после обратной транскрипции репертуар VHH клонируется в фагмидный вектор [2].

Фаговый дисплей антител основан на генной инженерии бактериофагов (вирусов, поражающих бактерии) и повторных раундах селекции [16]. Этот

метод позволяет отбирать высокоспецифичные моноклональные антитела *in vitro*. Продукты VHH, представляющие собой репертуар антител, лигируют в вектор фагового дисплея (фагмиду), которая слита с рIII – второстепенным капсидным белком нитевидного бактериофага M13 [66]. Тем не менее, зачастую фагмидный вектор не содержит всех других генов, необходимых для кодирования полного бактериофага в *E.coli*. Для добавления этих генов используется фаг-помощник. В результате получают библиотеку с множеством фагов, каждый из которых экспрессирует на своей поверхности антитело, а в капсиде содержит вектор с соответствующей нуклеотидной последовательностью. Фагмиды часто содержат в себе селективную кассету антибиотиковой устойчивости, а также различные тэги, например, гемагглютининовый (НА) и полигистидиновый, что обеспечивает легкую очистку антитела из раствора и его дальнейшее использование [16]. Далее полученная библиотека подвергается биопаннингу – скринингу на способность связывания антигена с фагом, несущим на себе специфическое антитело. Циклический паннинг позволяет идентифицировать в том числе редкие антигенсвязывающие клоны, и включает в себя следующие повторяющиеся шаги: связывание фага с антигеном, промывка, элюция и повторная амплификация связавшихся фагов в *E.coli*. Во время каждого раунда связавшиеся фаговые клоны извлекаются из общего пула библиотеки и элюируются, а несвязавшиеся смываются (рисунок 2). После трех или четырех раундов селекций индивидуальные клоны *E.coli*, несущие в себе фаг с высокоспецифичным антителом на поверхности, используют для направленного отбора на иммобилизованный антиген. Скрининг индивидуальных клонов проводят различными методами, как правило, для этого используется иммуноферментный анализ: для начала заражённый фагом клон инкубируют на планшете с иммобилизованным антигеном, затем промывают и с помощью фермент-конъюгированного антитела против белка капсида фага, и хромогенного субстрата оценивают фаговую специфичность.

Если фаг связывает желаемый антиген, фермент изменяет цвет или же окраска становится более интенсивной. Из этих фагов извлекают ДНК, определяют нуклеотидную последовательность и клонируют её в бактериальный или иной вектор для последующих получения и наработки антител.



Селекция клонов однодоменных антител

Рисунок 2 - Циклический биопаннинг фаговой библиотеки. Библиотека содержит в себе как клоны бактериофагов, несущих на своей поверхности высокоспецифичные антитела, так и неспецифичные варианты. В результате связывания с антигеном и последующей отмывки клоны с высоким сродством к антигену остаются в связанном состоянии, тогда как несвязавшиеся фаги смываются. Связавшиеся фаги элюируют и подвергают повторной амплификации (обогащению). После нескольких раундов селекций проводят скрининг индивидуально отобранных клонов.

Также на этапе селекции в нашей лаборатории используется метод параллельного рестрикционного анализа (фингерпринтирования) отбираемых последовательностей генов наноантител, NMR-анализ, позволяющий лучше контролировать процесс [10]. Для промежуточного анализа отбираемых клонов наноантител обычно используют ПЦР-амплификацию нуклеотидной последовательности единичной колонии, кодирующей целевой белок. Получаемый ПЦР продукт затем обрабатывают частощепящими рестрикционными эндонуклеазами, которые расщепляют ДНК на различные фрагменты за счёт узнавания разных сайтов в гипервариабельных участках антитела. Данная методика является альтернативой секвенирования, и именно с её помощью контролируются и исследуются результаты процедур селекций.

Метод получения наноантител из иммунных библиотек гораздо более эффективен в сравнении с подобным методом для иммунных библиотек scFv или Fab фрагментов [2]. Созревание в составе рецептора В-клеток VH-VL пара проходит вместе в случае классических антител. Однако при клонировании антиген-связывающего региона VH и VL амплифицируются отдельно, после чего они объединяются на последующих стадиях. Поэтому для того, чтобы покрыть разнообразие 10^5 В-лимфоцитов, требуется амплифицировать 10^5 VH регионов и 10^5 VL регионов, которые должны быть объединены друг с другом случайным образом, что потребует разнообразие библиотеки в 10^{10} клонов. Только в этом случае библиотека покроет весь исходный репертуар VH-VL пар. В случае же HCAs каждый VHH кодируется одним генным фрагментом в 350 п.н., и для покрытия репертуара 10^5 В-клеток, требуется клонирование 10^5 VHH. Это обстоятельство существенно упрощает работу с библиотеками VHH [2].

Прошедший отбор клон VHH может быть экспрессирован в растворимом и полностью функциональном виде в сравнительно больших

количествах. Уровень экспрессии scFv в среднем в десять раз ниже уровня VHH [45, 57, 67]. Кроме того, VHH обладают гораздо большей стабильностью в отношении температурных, химических и прочих воздействий [2]. Подробнее о свойствах VHH будет рассказано далее.

1.1.4. Свойства VHH

Благодаря своей однодоменной природе, VHH обладают уникальными свойствами и функциональными преимуществами. Масса одного белкового домена рекомбинантного VHH составляет 15 кДа, тогда как масса типичного антитела на основе scFv составляет 29-36 кДа [149]. Благодаря гидрофильным аминокислотным заменам на поверхности, соответствующей месту контакта VH и VL классических иммуноглобулинов, VHH менее склонны к агрегации и дольше сохраняются в растворимой форме [2]. Также наноантитела удобно нарабатывать в бактериальной системе экспрессии. Выход белка при наработке в *E.coli* составляет 1-10 мг/л, тогда как scFv в аналогичных условиях экспрессируется в 10 раз меньше [14]. Имеется возможность экспрессии VHH в дрожжах, растениях и клетках млекопитающих, где, при подборе оптимальных условий, выход целевого белка может быть еще больше. Для очистки рекомбинантных VHH может быть использован широкий спектр методов. Наиболее универсальные бактериальные экспрессионные системы позволяют накапливать VHH в периплазме, кислая среда которой способствует образованию дисульфидных связей и правильной упаковке молекулы [2]. Система выделения полностью функциональных VHH из бактериальных периплазматических экстрактов крайне проста – для этого используется методика осмотического шока [150]. А включение С-концевого 6-гистидинового тэга позволяет легко очищать эти антитела путём метал-хелатной аффинной хроматографии (Ni-NTA агароза).

Однодоменные антитела проявляют высокую стабильность при температурных воздействиях. Установлено, что VHH верблюда содержит

дополнительную дисульфидную связь в антиген-связывающем сайте [60, 152], которая в значительной степени способствует устойчивости VHH к термическим воздействиям. Удаление этой дисульфидной связи с помощью сайт-направленного мутагенеза блокирует рефолдинг антитела [140, 161]. Наличие неканонической дисульфидной связи между каркасными областями FR2 и FR3 в VHH повышает термическую стабильность белка, его устойчивость к протеолитической деградации, а также обеспечивает стабильность антител при низких значениях pH [79, 172]. Показано, что потеря активности VHH при тепловой обработке является химической по своей природе и происходит за счёт расщепления пептидов вблизи аминокислотных остатков цистеина и аспарагина. Замена цистеина на некоторые другие аминокислоты улучшает термостабильность нативного VHH [12].

В отличие от классических моноклональных антител однодоменные антитела сохраняют способность связывания с антигеном при температурах, достигающих даже 90°C [162]. На примере VHH и мышинных моноклональных антител, связывающихся с молекулами кофеина, была продемонстрирована высокая стабильность первых: неканонические антитела сохраняли более 90% своей активности после инкубации при 90°C в течение 20 мин [92]. Коммерческие моноклональные антитела теряли способность связываться с антигеном после инкубации при 70°C и выше. Также проводилось исследование стабильности VHH на примере анти-гаптеновых однодоменных антител [158]. Экспериментально оценивалось пять вариантов таких наноантител, большинство из которых оказались более стабильными при 85°C и 100°C по сравнению с аналогичными кроличьими поликлональными антителами. Одно из пяти наноантител утратило свою активность при 85°C, однако другие VHH сохраняли высокую связывающую способность после часа инкубации при 85°C. Такая активность до некоторой

степени сохранялась даже после часовой инкубации при 100°C. На примере наноантитела против дифенилового эфира было показано, что оно сохраняет более 50% своей активности при воздействии 95°C в течение 10 мин и более 25% активности при воздействии 95°C в течение часа, тогда как активность поликлонального антитела и в первом, и в другом случае становится ниже 6% [19]. Проводилась сравнительная оценка термостабильности нанотантител и моноклональных антител, распознающих афлатоксин. После инкубации в течение 1 часа при 85°C VHH сохраняли около 70% своей активности, тогда как моноклональные антитела теряли способность связывать антиген уже после 15 минут такой инкубации [68]. Эти результаты показывают, что VHH являются привлекательным инструментом для проведения экспериментов, чувствительных к температуре.

Также VHH устойчивы в отношении таких денатурирующих агентов как мочевины, гуанидина гидрохлорид и аммония изотиоцианат, что делает их незаменимыми иммуноадсорбентами [17]. Высокая способность к ренатурации из полностью денатурированного состояния делает возможным многократное использование VHH [2].

Как упоминалось выше, с точки зрения генно-инженерных манипуляций малый размер однодоменных антител является одним из их преимуществ над моноклональными антителами и их фрагментами. При этом с помощью однодоменных антител можно получать инструменты и с более высокой молекулярной массой и, соответственно, лучшей авидностью. В случае использования многовалентных реагентов наблюдается резкое увеличение их функционального сродства к иммобилизованному антигену. Например, сообщается о простом способе получения многовалентных VHH, когда однодоменное антитело сливается с В-субъединицей веротоксина *E. coli*, формирующей гомопентамер. Это приводит к полимеризации VHH в результате чего формируются пентавалентные антитела. Было показано, что

использование таких наноантител для детекции паратиреоидного гормона увеличивает их avidность на три-четыре порядка [174, 175]. Сообщается о 400-кратном увеличении функционального сродства пентамеров VHH, распознающих грамотрицательную бактерию *Campylobacter jejuni*, по сравнению с мономерными наночастицами [130]. В нашей лаборатории также получен новый тип форматированных тримеризованных однодоменных антител, тримеризация которых достигается за счёт встраивания последовательности изолейцинового zipper (ILZ) в С-конец однодоменного антитела. Например, интраназальное введение 50 мкг такого антитела мыши, заражённой летальной дозой вируса птичьего гриппа (H5N2), обеспечивает её выживаемость даже при введении антитела по истечении 24 часов после заражения [159].

Другим интересным подходом к созданию многовалентных конструкторов является конъюгация VHH с многоцепочечными белками, такими как стрептавидин (SC), авидин, или ризавидин (RZ) [99]. В отличие от авидина или стрептавидина, ризавидин образует гомодимер вместо тетрамера. Сообщается, что биоконъюгат VHH-ризавидин экспрессируется в 20 раз лучше, чем его аналог со стрептавидином. Кроме того, VHH-RZ – это однородный раствор, в то время как VHH-SC склонен к агрегации. По сравнению с немодифицированным VHH, и VHH-SC и VHH-RZ оказались более чувствительными при детекции соответствующего антигена, при этом VHH-RZ обладает уникальным динамическим диапазоном – спектром концентраций белка, которые можно инструментально измерить. Предполагается, что это может быть связано с небольшими размерами антитела. Таким образом, многовалентные конструкции на основе VHH являются новым перспективным инструментом для обнаружения малых молекул и создания потенциальных методов улучшения существующих анализов.

1.1.5. Возможные области применения VHH

Продемонстрирована возможность использования наноантител в качестве ингибиторов ферментов [33, 36, 88, 96, 103], аффинных лигандов [87], интрател [62, 80, 136], зондов в биосенсорах [75, 123, 141], а также в качестве инструмента для обнаружения антигенов в живых клетках [137] и изучения белок-белковых взаимодействий [77]. Благодаря своим малым размерам и пониженной усложнённости паратопов, наноантитела являются идеальными кандидатами для разработки небольших пептидомиметиков. По своим размерам и молекулярной массе верблужьи наноантитела похожи на некоторые токсины, например, на яд скорпиона, что позволяет предположить у них схожие профили биологического распределения и, как следствие, эффективную нейтрализацию токсинов [71].

Наноантитела и их производные используются в качестве универсальных инструментов для биовизуализации из-за их небольших размеров и высокого сродства к различным мишеням, например, внутриклеточным сигнальным молекулам и биомаркерам рака [108]. Используя флюоресцентные однодоменные фьюжн-белки или наноантитела против GFP, разрабатываются конструкторы для биоимиджинга в живых клетках. Внутриклеточная экспрессия таких “chromobody” (генетически слитых наноантитела и флуоресцентного белка) позволяет отслеживать мишени в различных клеточных компартментах *in vivo* [117, 137], при этом отпадает необходимость генетической модификации таргетных белков с целью внедрения в них флюоресцентных тэгов. Например, были получены так называемые GFP-связывающие белки (GBP) - наноантитела против GFP, слитые с мономерным красным флюоресцентным белком (RFP). Полученное GFP-связывающее наноантитело может специфически связываться с внутриклеточными GFP фьюжн-белками, локализованными в цитоплазме или ядре [137]. На основе однодоменных антител получены инструменты для

прямой визуализации эндогенных нативных белков или вирусов (например, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ)) в живых клетках [69, 176]. Кроме того, GBP также применяется в микроскопии с высоким разрешением для визуализации гибридных белков GFP. Слитый с органической краской GBP способен распознавать любой GFP-меченый конструкт, что при помощи технологии получения сверхвысоких изображений позволяет локализовывать одиночные молекулы [108, 132]. Наночастица золота, функционализированная GBP, также может использоваться для распознавания одиночных молекул с целью наблюдения за GFP-мечеными мембранными белками и отслеживания внутриклеточных белков в живых клетках за счёт интернализации [38, 97].

Зонды на основе VNH применяют для изучения белок-белковых взаимодействий *in vivo*. Для этих целей получают довольно сложные конструкты. Вначале GBP сливают с якорным белком, который будет локализовать GBP в определенном субклеточном компартменте. Затем флуоресцентный белок GFP или RFP сливают с двумя целевыми белками. Как только происходит взаимодействие двух белков-мишеней, образуется сильный сигнал колокализации GFP-RFP в субклеточном компартменте, что и детектирует GBP. Такой подход уже использовался для анализа процессов в ядре и цитозоле клеток человека. Пептидные ингибиторы белок-белковых взаимодействий в этих внутриклеточных компартментах анализировались именно таким способом [38, 70].

Также на основе наноантител разработаны универсальные нанотрубки, с помощью которых можно изучать различные конформационные варианты мишеней, и даже менять транслокацию и локализацию этих мишеней в различных органеллах живых клеток [85, 135, 136, 147]. Например, получены наночастицы, которые могут модулировать конформацию и спектральные свойства GFP. Продемонстрирована возможность изменения локализации

заданных биомолекул на примере белка промиелоцитарного лейкоза. Естественным образом этот белок находится во всех участках ядра, тогда как фьюжн такого белка с GFP специфически перенаправляется на ядерную пластинку (ламину) за счёт коэкспрессии якорного белка GBP-lamin1 [108, 136].

Помимо возможности использования однодоменных антител в качестве универсальных инструментов для биоимиджинга в живых клетках, наноантитела также востребованы в качестве зондов для выявления рака, инфекционных заболеваний, атеросклеротических поражений, воспалительных реакций и многих других заболеваний. Наноантитела быстро удаляются из кровотока из-за их небольшой молекулярной массы [108, 165]. Малый размер VHH обеспечивает их быструю экстравазацию, хорошее проникновение в опухоль и быстрый почечный клиренс, что приводит к быстрой и чувствительной визуализации ткани-мишени через несколько часов после введения антител [38, 74, 165]. Также хороши наноантитела и для *in vivo* визуализации [108]. Радионуклидные меченые VHH успешно используются для неинвазивного имаджинга опухолей *in vivo* с помощью позитронно-эмиссионной томографии и однофотонной эмиссионной компьютерной томографии. Такие меченые наноантитела продемонстрировали высокую специфичность и стабильность, хорошую растворимость, быстрое выведение избыточной метки и низкую иммуногенность. Установлено, что в целях прогнозирования эффективности антираковой терапии могут использоваться конъюгаты VHH и радионуклидного технеция (^{99m}Tc). Было продемонстрировано, что с помощью таких конъюгатов можно детектировать раковый антиген HER2, важный маркер рака молочной железы, и определять уровень экспрессии рецептора эпидермального фактора роста, мутации которого могут приводить к развитию онкологических заболеваний [74, 166]. Такой

конъюгат может применяться для определения статуса воспалительных реакций путем визуализации дендритных клеток [37] и таргетирования VCAM1, антигена, используемого для поиска атеросклеротических бляшек [25].

Помимо многообещающих результатов, полученных с использованием ^{99m}Tc -VНН, период полураспада которого составляет ~ 6 часов, изучаются и тестируются также и другие короткоживущие нуклиды. Быстрое распознавание повреждённой ткани и очищение из крови несвязанных наноантител позволяют использовать для *in vivo* диагностики такие короткоживущие нуклидные метки, как галлий ^{68}Ga и фтор ^{18}F с периодами полураспада 68 минут и 110 минут соответственно. Использование наноантител, сшитых с такими радионуклидами, обеспечивает пациентам низкую радиационную нагрузку [108]. Недостатком использования именно этих однодоменных антител в качестве *in vivo* зондов является высокое накопление несвязавшихся конъюгатов в почках вскоре после инъекции, что может привести к высокой дозе облучения почек и затруднить последующий анализ близлежащих тканей [25, 37, 38, 165]. В качестве альтернативы для *in vivo* имаджинга опухолей изготавливаются нерадиоактивные зонды на основе VНН с флуорофорами ближнего инфракрасного диапазона. Такие VНН также показывают более быструю визуализацию по сравнению с одобренными моноклональными антителами, распознающие те же самые антигены [38, 84, 118].

Препараты на основе наноантител используются и для обнаружения биомаркеров в жидкостях тела человека. Например, для чувствительного обнаружения таких молекул в сыворотках пациентов используется биотинилированный VНН, работающий «в паре» со стрептавидиновыми частицами [38, 49]. Что касается диагностики патогенов, то для этого традиционно используются моноклональные антитела. И хотя они

распознают патогенные антигены с высокой чувствительностью, зачастую специфичность таких препаратов недостаточна, что приводит к неудовлетворительным результатам. Показано, что в этом отношении однодоменные антитела намного превосходят традиционные моноклональные конструкторы. Например, некоторые инфекции, вызываемые бактериями рода *Brucella* и *Yersinia* у домашнего скота успешно распознаются именно VHH, а не обычными антителами [11]. *Taenia solium* (свиной цепень) у свиней успешно детектируется видоспецифичными VHH, тогда как существующие моноклональные антитела не способны различать *T. Solium* и *T. hydatigena* [39]. Для диагностики паразитов рода *Trypanosoma* синтезированы как видо-, так и родоспецифичные VHH, способные детектировать антиген без его предварительной очистки, что обеспечивает быстрое обнаружение этих паразитов в анализируемом препарате [38, 139]. Создан реагент на основе наночастиц, который представляет собой фьюжн целевого антигена и VHH, распознающего эритроциты. Было показано, что такие конъюгаты, получаемые при слиянии антигена ВИЧ p24 с эритроцит-специфичным VHH могут использоваться для диагностики ВИЧ [64]. В случае, если в сыворотке ВИЧ-положительных пациентов присутствуют антитела против p24, будет происходить процесс агглютинации, опосредованный как собственными антителами, так и фьюжн-белком p24-VHH [38].

Также следует отметить важность полученных нами однодоменных антител к мажорным классам иммуноглобулинов, что открывает дополнительные возможности диагностики на основе анализа относительных количеств и подвижностей в геле разных иммуноглобулинов и позволяет адаптировать наноантитела для их использования в ИФА в качестве детектирующих–визуализирующих агентов при анализе специфического связывания целевых иммуноглобулинов с антигенами.

Перспективным направлением является использование VHH в составе биспецифических конструкторов и других комплексных лекарственных средств. Использование такого конструктора может способствовать распределению лекарства в нужной части тела, ткани или органе и увеличивать время циркуляции терапевтического препарата в крови. Это продемонстрировано для многомодульных конструкций, связывающихся с сывороточным альбумином [23]. Так, бельгийская компания «Ablynx» (в сотрудничестве с «Pfizer») разработала новый ингибитор провоспалительного цитокина – фактора некроза опухолей (TNF- α). Этот ингибитор представляет собой гуманизированное тривалентное биспецифическое наноантитело, которое содержит 2 домена, связывающих TNF- α , и один домен, связывающий сывороточный альбумин. Данный препарат, названный ATN-103, или Ozoralizumab, прошел вторую стадию клинических испытаний на пациентах с ревматоидным артритом [93].

В перспективе однодоменные антитела могут использоваться для создания универсальной вакцины против гриппа. В 2018 году международной группой исследователей было получено мультидоменное антитело MD3606, сконструированное на основе разнообразных однодоменных антител и узнающее высококонсервативные эпитопы гемагглютинина вирусов гриппа А и В. Введение такого антитела внутривенно или в составе экспрессионной конструкции на основе рекомбинантного аденоассоциированного вирусного вектора обеспечивает полную выживаемость мышей при их инфицировании вирусами гриппа А и В [95].

На сегодняшний день на рынке уже существует препарат на основе однодоменных антител - Каплацизумаб (Caplacizumab, ALX-0681, Cablivi™). В сентябре 2018 года фармкомпания Ablynx (являясь на тот момент подразделением Sanofi) вывела его на Европейский фармацевтический

рынок, а в 2019 году этот препарат был одобрен FDA. Каплацизумаб предназначен для лечения тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП). Это аутоиммунное заболевание, которое сопровождается наличием тяжелой тромбоцитопении (пониженным содержанием тромбоцитов крови), гемолитической анемии (аномальным разрушением эритроцитов) и ишемией тканей вследствие их недостаточного кровоснабжения, что может приводить к инсульту или инфаркту миокарда. ТТП существует в двух формах: врожденной и приобретенной, причем последняя составляет > 90% случаев. В основном причиной развития патологии служит генерирование организмом аутоантител, ингибирующих металлопротеазу ADAMTS 13 (**a disintegrin and Metalloprotease, thrombospondin-1-like domain**). Данный фермент отвечает за расщепление сверхкрупных мультимеров фактора фон Виллебранда (ultra-large von Willebrand factor, ULvWF). Фактор фон Виллебранда (англ. von Willebrand factor, VWF) - это гликопротеин крови, участвующий в гемостазе, основная функция которого заключается в связывании с другими белками в процессе адгезии тромбоцитов. В результате нарушения активности ADAMTS13 молекулы ULvWF спонтанно связываются с тромбоцитами, что приводит к формированию микросгустков в небольших кровеносных сосудах. Смертность от данного заболевания составляет 10-20%, а после окончания первоначального стандартного лечения (плазмафереза и иммуносупрессивной иммунотерапии) рецидив наступает примерно у 36% пациентов.

Каплацизумаб представляет собой бивалентное однодоменное антитело, инактивирующее ULvWF посредством связывания с его A1-доменом и препятствующее таким образом связыванию ULvWF с тромбоцитами. Рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое клиническое исследование фазы 3 показало, что использование данного препарата совместно со стандартными методиками

лечения приводит к значительному снижению смертности и рецидивов у пациентов. Каплализумаб — это первая и, на сегодняшний день, единственная одобренная FDA терапия для взрослых с приобретенной тромботической тромбоцитопенической пурпурой в сочетании с плазмаобменом и иммуносупрессивной терапией.

1.2. Протеом крови

1.2.1. Методы исследования белков крови

Белки плазмы крови выполняют различные функции: поддерживают онкотическое давление, участвуют в транспорте небольших молекул, контролируют свертывание крови, воспалительные реакции и многое другое. Методы количественного определения и фракционирования белков основаны на таких подходах, как турбидиметрия, колориметрия, абсорбционная спектрофотометрия, связывание с красителем, колоночная хроматография, электрофоретическое разделение и иммуноанализ. Подобные исследования являются ценными диагностическими процедурами, поскольку такие анализы используются для оценки изменений или отклонений в белковом составе крови, что указывает на протекание какого-либо патологического процесса. Чаще всего анализы для изучения общего белка крови проводят на сыворотке — она, в отличие от плазмы, не содержит в своём составе фибриноген, и, соответственно, к ней не добавляются антикоагулянты, которые могут слегка разбавлять содержащиеся в ней белки. Определение общего белка крови является довольно информативным анализом для понимания статуса пациента в целом — он помогает выявить тяжёлые болезни каких-либо органов или проблемы, вызванные недостаточным или нарушенным питанием. При этом дальнейшие углубленные анализы могут дать более глубокую, клинически полезную, информацию. Например, дополнительное количественное определение альбумина позволяет тщательнее изучить пищевой статус пациента и оценить способность его

печени синтезировать белки. Подсчёт количественных различий между общим белком и альбумином показывает содержание глобулинов, составных белков других фракций, количество которых может возрасть при ряде расстройств и тяжёлых патологий.

Одной из наиболее распространённых методик для разделения белков плазмы крови является электрофорез. Этот метод позволяет разделить белки сыворотки крови на группы с одинаковым размером, формой и зарядом. Сыворотка крови содержит две основные белковые группы: альбумин и глобулины. Используя белковый электрофорез, эти две группы можно разделить на пять подфракций: альбуминовая, альфа-1 глобулины, альфа-2 глобулины, бета-глобулины и гамма-глобулины (антитела). Каждая из этих пяти групп движется с разной скоростью в электрическом поле и вместе образует определенную электрофореграмму. В качестве твёрдого носителя могут использоваться ацетатцеллюлозная мембрана, агарозный гель, крахмальный гель и полиакриламид. Идентификация этих пяти фракций – полезный скрининговый метод, позволяющий выявить и количественно оценить отклоняющиеся от нормы полосы белка. Электрофорез белков крови также является полезным инструментом для мониторинга состояния пациента в течение длительного периода времени, особенно в случае таких диагнозов как миелома, нефротический синдром, цирроз или обширный ожог тела.

Химическая преципитация белков сыворотки используется для разделения альбумина и глобулинов на две или более фракции, которые затем оцениваются на предмет количественного содержания белка. При добавлении сульфата натрия, сульфита натрия, сульфата аммония или метанола глобулины осаждаются, при этом альбумин остаётся в растворе. Количественные значения для альбумина и иммуноглобулинов получают измеряя общий белок в исходной сыворотке и сравнивая его с количеством

белков в получившихся осадке и супернатанте. Соотношение значений альбумин/глобулины используется для обнаружения ряда заболеваний, при которых количество альбумина в сыворотке снижается, а уровень глобулинов, наоборот, возрастает. Выработка альбумина может снижаться по причине недоедания, мальабсорбции (недостаточной всасываемости питательных веществ в тонкой кишке), печеночной недостаточности, или в результате потери белка (протеинурия, накопление асцитной жидкости, энтеропатия). Уровень глобулинов может увеличиваться из-за повышения синтеза различных белков в результате острой или хронической реакции на болезнь. Методы осаждения не так точны, как вышеописанный зональный электрофорез, поскольку в такой постановке эксперимента некоторые α -глобулины могут не осаждаться, что приводит к искусственному повышению фракции альбумина. Как правило, к методам осаждения прибегают тогда, когда необходимо проанализировать некий низкопредставленный белок крови, для чего требуется удалить большую часть нежелательных сывороточных белков. Затем очищенную кровь пропускают через колонку, которая разделяет белки либо по принципу их различий в молекулярных размерах (гель-фильтрация), либо заряда (ионный обмен).

Для гель-фильтрации в качестве твердых носителей используются сефадекс или агарозные гранулы, размеры пор которых определяют, в какой последовательности молекулы белков будут проходить через колонку. Крупные молекулы проходят через столбик колонки не задерживаясь на поверхности агарозных частиц, и выходят первыми. Более мелкие молекулы «цепляются» за небольшие поры, и, следовательно, их проход через колонку замедляется. Малые молекулы белка проникают в меньшие поры и сохраняются в объеме колонки ещё дольше. Наконец, частицы крайне малых размеров проникают в глубину гель-фильтрационных шариков и выходят после всех белков.

При хроматографии молекулы белков связываются с агарозными гранулами за счёт заряда. Анионообменную хроматографию обычно проводят при базовом рН 8.6, когда белки либо отрицательно заряжены (альбумин, $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - и β -глобулины являются анионами), либо не имеют заряд (γ -глобулины). Нейтральнозаряженные белки сразу проходят через колонку, тогда как анионные задерживаются на положительно заряженной матрице. При промывании колонки высокосолевым буфером анионы соли вытесняют связавшиеся с агарозой белки. Затем белки элюируют. Постоянно увеличивающийся градиент концентрации соли позволяет элюировать белки с разным зарядом. Сначала элюируются белки с небольшим зарядом, тогда как те, у которых наибольший заряд (например, альбумин), элюируются только при более высокой концентрации соли. И наоборот, при понижении рН и использовании низкой концентрации соли анионные белки приобретают нейтральный или слегка положительный заряд и проходят через колонку. Ещё одним способом разделения белков на колонке является гидрофобная хроматография, при которой образцы на колонку наносят в высокосолеовом буфере, а элюируют в низкосолеовом, в результате чего происходит взаимодействие матрицы с гидрофобными белками.

Аффинная хроматография основана на специфическом взаимодействии целевого белка-мишени с белком, иммобилизованным на твердой матрице. В качестве второго обычно используются антитела. Полученный комплекс антиген-антитело может быть разрушен высокой концентрацией соли, изменением рН или денатурирующим агентом, например, мочевиной. С иммуносорбентом антитело можно связать как напрямую, например, за счёт ковалентных реакций, так и косвенно. Косвенное связывание осуществляется, если на носителе дополнительно иммобилизуют белки А или G, которые способны связывать некоторые иммуноглобулины, взаимодействуя с их тяжёлыми цепями. Помимо антител на матрице можно

иммобилизовать различные красители, лекарственные средства, сахара и нуклеотидные кофакторы. Клиническим тестом с использованием аффинной хроматографии является количественное определение гликозилированного гемоглобина с использованием аффинной матрицы дигидроксидбората. Такая матрица селективно связывает гликозилированную форму гемоглобина, пропуская негликозилированные молекулы через колонку.

Капиллярный электрофорез представляет собой метод разделения, основанный на использовании капилляра, который можно адаптировать к разделению различных молекул по размеру, гидрофобности или стереоспецифичности. Такой метод применим для разделения как крупных молекул, таких как ДНК или белки, так и малых, например, гормонов. При капиллярном электрофорезе сыворотки используется колонка со свойствами, подобными агарозе. Несмотря на широкое распространение метода, подобным образом трудно идентифицировать и количественно определить наличие некоторых диагностически важных белков, в частности, моноклонального белка. Такой белок присутствует в крови у больных миеломой и структурно ничем не отличается от нормального иммуноглобулина. Диагностировать патологию можно при помощи электрофоретического анализа: в случае заболевания происходит перераспределение иммуноглобулинов в сторону какого-либо одного класса, в то время как у здорового человека обнаруживается их более равномерное распределение. Пик иммуноглобулина объясняется тем что все миеломные клетки идентичны по своей структуре и по вырабатываемому классу иммуноглобулина (G, A, M, E). Выявление такого пика является анализом на определение моноклонального белка (также его называют М-градиентом или парапротеином). Использование капиллярного электрофореза для детекции парапротеина допустимо, если концентрация моноклональных белков

достаточно высока, но при более низких концентрациях этих белков их идентификация подобным способом становится затруднительной [76].

1.2.2. Высокопредставленные белки плазмы крови

Плазма/сыворотка крови – один из самых легкодоступных и, в то же время, один из самых сложных образцов для исследования протеома. Кровь содержит в себе около 8000 белков, помимо собственно белков плазмы в ней присутствуют подмножества других тканевых субпротеомов. Однако 97% всего этого многообразия приходится всего на десять белков плазмы крови: альбумин, иммуноглобулины классов G, A и M, фибриноген, трансферрин, альфа-2-макроглобулин, альфа-1-антитрипсин, С3 компонент комплемента, гаптоглобин. Такие белки называют высокопредставленными. Наиболее распространенными белками являются альбумин и тяжёлые и лёгкие цепи иммуноглобулинов, на их долю приходится 80% всех белков плазмы [54]. Самым же распространённым белком является альбумин – он составляет 55% от всех белков крови. В этом разделе речь пойдёт о тех высокопредставленных белках, к которым в ходе выполнения данной работы были получены наноантитела.

Сывороточный альбумин человека (СА) представляет собой мономерную мультидоменную макромолекулу и является главным модулятором распределения жидкости между различными частями тела. СА – ценный биомаркер многих заболеваний, включая рак, ишемию, ревматоидный артрит, реакции трансплантат-против-хозяина, ожирение, а также ряда заболеваний, требующих контроля гликемического уровня. Кроме того, СА широко используется в клинике для лечения гиповолемии (уменьшения объёма циркулирующей в организме крови), шока, ожогов, кровопотери в результате хирургических вмешательств, травм, кровотечения, острого респираторного дистресс-синдром, гемодиализа, острой печеночной недостаточности, хронических заболеваний печени и гипоальбуминемии

(снижения уровня альбумина в крови пациента) [50]. Низкие уровни СА связаны с повышенным риском смертности и с увеличением вероятности заболеваний сердечно-сосудистой системы [27].

У больных ревматоидным артритом часто развивается гипоальбуминемия, что обусловлено активным поступлением СА в участки воспаления [91]. В связи с этим сывороточный альбумин является идеальным кандидатом для доставки лекарственных средств в воспалённые суставы пациентов [63]. Кроме того, можно создавать биспецифические конструкторы, которые будут включать себя, с одной стороны, наноантитела к сывороточному альбумину, связываясь с ним, с другой – лекарственный препарат против ревматоидного артрита (например, антиревматический метотрексат). Благодаря наличию антител к сывороточному альбумину, препарат будет доставлен непосредственно к очагу воспаления. Также подобные конструкторы на основе наноантител к сывороточному альбумину позволят лекарственному средству дольше циркулировать в кровотоке и сохранять свою активность, поскольку в среднем период полураспада (полувыведения) альбумина составляет 15-20 дней.

Следующими по распространённости белками плазмы крови являются иммуноглобулины. На сегодняшний день известно о существовании у млекопитающих пяти классов иммуноглобулинов — А, G, D, M, E. Они различаются по размерам и функциям, выполняемым при иммунном ответе (таблица 1).

Класс IgG классифицируют на четыре подкласса (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), класс IgA — на два подкласса (IgA1, IgA2). Все классы и подклассы составляют девять изотипов, которые присутствуют в норме у всех индивидов. Каждый изотип определяется последовательностью аминокислот константной области тяжёлой цепи. Согласно имеющимся на сегодняшний день данным, одной из важных задач видится разделение различных

подклассов IgG из общей смеси. Например, сравнение эффектов очищенных подклассов IgG на вирус простого герпеса показало, что наибольшей способностью нейтрализовать вирус обладают IgG3 и IgG4, даже если они не являются преобладающим подклассом. Изучение иммунного ответа против человеческого энтеровируса с использованием очищенных подклассов IgG показало, что IgG1 и IgG2 фракции наиболее эффективны для нейтрализации, а IgG3, напротив, усиливает инфекцию. Эти исследования подчеркивают потенциальную ценность очистки конкретных подклассов IgG из сыворотки.

Полученные в ходе данной диссертационной работы моноклональные наноантитела к IgG пока не проанализированы на предмет конкретного узнаваемого ими эпитопа в IgG, однако в будущем планируется работа по идентификации подклассов этих наноантител.

Таблица 1. Характеристика классов иммуноглобулинов. Адаптированная таблица по [112].

Класс иммуноглобулина	Свойства	Функция	Механизм действия	Влияние на иммунный ответ	Условия применения	Примечания
IgG1	Универсальный	90%	Связывание с антигенами	100%	10-15 лет	Длительное действие, высокая специфичность, не вызывает аллергии
IgG2	Патогенный	8-10%	Связывание с антигенами	100%	8-10 лет	Длительное действие, высокая специфичность, не вызывает аллергии
IgG3	Длительный	1-17%	Связывание с антигенами	100%	8-10 лет	Длительное действие, высокая специфичность, не вызывает аллергии
IgG4	Универсальный	10%	Связывание с антигенами	100%	10-15 лет	Длительное действие, высокая специфичность, не вызывает аллергии
IgE	Универсальный	0-10%	Связывание с антигенами	100%	10-15 лет	Длительное действие, высокая специфичность, не вызывает аллергии

Альфа макроглобулины – гликопротеины, которые присутствуют в жидкостях тела как позвоночных, так и беспозвоночных. Альфа-2-макроглобулин ($\alpha 2M$) – гомотетрамер с высокой молекулярной массой – является ключевым членом семейства альфа макроглобулинов. $\alpha 2M$ имеет множество разнообразных и сложных функций, но в первую очередь известен своей способностью ингибировать широкий спектр протеиназ без прямого блокирования активного сайта протеазы. $\alpha 2M$ может ингибировать практически любую протеиназу, независимо от её специфичности и каталитического механизма. $\alpha 2M$ также выполняет регуляторную, транспортную и множество других функций. Например, помимо ингибирования протеиназ, $\alpha 2M$ регулирует связывание трансферрина с его поверхностным рецептором, связывает дефензин и основной белок миелина, связывает несколько важных цитокинов: основной фактор роста фибробластов (bFGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), фактор роста нервов (NGF), интерлейкин- 1β (ИЛ- 1β), и интерлейкин-6 (ИЛ-6), а также изменяет их биологическую активность. $\alpha 2M$ способен связывать ряд гормонов и регулировать их деятельность. $\alpha 2M$ защищает организм от различных инфекций, и, следовательно, может использоваться в качестве биомаркера для диагностики и прогнозирования ряда заболеваний. Специфическое удаление из плазмы крови $\alpha 2M$ может также соудалать ассоциированные с этим белком протеазы, что может приводить к большей стабильности белков в истощенной плазме [129].

Фибриноген – это гликопротеин с молекулярной массой 340 кДа. Он составляет 3-5% общего белка плазмы и синтезируется в печени. Из фибриногена формируется сгусток фибрина, что играет ключевую роль в процессе коагуляции крови. Однако когда молекулярные и клеточные механизмы функционирования фибриногена в тканях были изучены более подробно, роль этой молекулы вышла за рамки только лишь

предшественника фибрина. Выяснилось, что фибриноген – это многогранная сигнальная молекула с широким спектром функций, которая осуществляет баланс между гемостазом и тромбозом, коагуляцией и фиброзом, защитой от инфекций и обширным воспалением. Фибриноген является одним из ключевых регуляторов воспаления. В частности, сообщается о провоспалительной роли фибриногена при болезнях сосудов, инсульте, травмах головного и спинного мозга, рассеянном склерозе, болезни Альцгеймера, ревматоидном артрите, бактериальных инфекциях, колитах, фиброзах почек и лёгких, мышечной дистрофии Дюшена и нескольких типов рака. Фибриноген – это один из основных белков острой фазы, и его биосинтез возрастает с увеличением воспаления и стресса [51, 169]. Таким образом, повышение уровня фибриногена в плазме крови может наблюдаться во время острой фазы воспалительного ответа, что может служить дополнительным маркером различных воспалительных процессов [138]. Удаление фибриногена из крови может существенно замедлить ее коагуляцию.

Трансферрины представляют собой железо-связывающие гликопротеины плазмы крови, которые контролируют уровень свободного железа (Fe) в биологических жидкостях. Гликопротеины трансферрина связывают железо крепко, но обратимо. Хотя трансферрин-связанное железо составляет менее 0,1% общего количества железа в организме, оно формирует наиболее жизненно важный пул железа с самым высоким уровнем обновления (25 мг / 24 ч). Трансферрин также важен для работы врожденной иммунной системы. Он присутствует в слизистых оболочках и связывает железо. В условиях дефицита свободного железа бактерии снижают способность к размножению. Также уровень трансферрина снижается при воспалении [133]. Повышенный уровень трансферрина в крови часто наблюдается у пациентов, страдающих железодефицитной

анемией, во время беременности. Показано, что трансферрин и его рецептор уменьшают опухолевые клетки, когда рецептор используется для привлечения антител [101].

1.2.3. Низкопредставленные белки плазмы крови и способы их детекции

97-99% белков плазмы крови являются высокопредставленными. Остальные 1-3% - это низкопредставленные белки. Тем не менее, предполагается, что этот небольшой процент содержит в себе тысячи белков плазмы, многие из которых являются ценными биомаркерами различных заболеваний, в том числе рака. Например, одним из известных классов диагностически ценных низкопредставленных белков являются цитокины. Цитокины представляют собой семейство сигнальных полипептидов, участвующих в межклеточных взаимодействиях в процессе иммунного ответа, а также в регуляции ряда нормальных физиологических функций. Цитокины используются в медицине для лечения рака, нарушений в работе иммунной системы, вирусных инфекций и других социально значимых заболеваний. Интерлейкин 6 (ИЛ-6) оказывает большое влияние на клетки иммунной системы, и часто проявляет гормоноподобные характеристики, которые влияют на гомеостатические процессы. ИЛ-6 обладает как про-, так и противовоспалительными свойствами, и в настоящее время считается важной мишенью для клинического вмешательства. Он способен влиять на липидный обмен, инсулинорезистентность, митохондриальную активность, работу нейроэндокринной системы, течение сосудистых заболеваний и нейропсихологическое поведение [18, 72, 78, 83, 90, 104, 134, 146, 169]. Почти все стромальные клетки и клетки иммунной системы продуцируют ИЛ-6. Нормальная физиологическая концентрация ИЛ-6 в сыворотке крови человека довольно низкая (1-5 пкг/мл), но она быстро повышается при ряде заболеваний и в экстремальных состояниях (например, при менингококковом септическом шоке) может достигать 1 мг/мл. Таким образом, уровень

экспрессии ИЛ-6 зависит как от гомеостатической регуляции, так и от необходимости быстрого системного ответа во время инфекции, аутоиммунных и раковых процессов в организме. В таких случаях уровень ИЛ-6 является даже лучшим прогностическим параметром, чем, например, контроль концентрации С-реактивного белка, анализ которого часто используется для оценки острых воспалительных процессов [55, 78, 107, 121]. Дефицит ИЛ-6 приводит к нарушению врожденного и адаптивного иммунитета, к увеличению вирусных, паразитарных и бактериальных инфекций [43, 58, 73, 78, 89, 90, 100, 111, 151, 164]. Было показано, что у детей, имеющих аутоантитела, ингибирующие ИЛ-6, развиваются рецидивирующие воспаления соединительной ткани и подкожные абсцессы, вызванные стафилококком [127]. Аналогичным образом у пациентов с синдромом гипериммуноглобулинемии Е проявляются нарушения активности ИЛ-6. Данное заболевание характеризуется аутосомными мутациями в гене, кодирующем фактор транскрипции STAT3, который необходим для нормальной передачи сигнала для данного цитокина. Вследствие такой мутации пациенты становятся восприимчивы к рецидивирующим инфекциям кожи, легких и кишечника и часто преждевременно погибают от пневмонии, вызванной грамотрицательными бактериями или нитчатыми грибами [56, 78].

Одним из способов оценки важности цитокина в борьбе с патогенами является наблюдение за способностью микроорганизмов имитировать или нарушать его функции. Например, человеческий вирус герпеса 8 типа экспрессирует вирусную форму ИЛ-6, которая обладает ~ 60% сродством аминокислот с человеческой формой цитокина. Вирусная форма ИЛ-6 может блокировать рекрутинг нейтрофилов [52, 78], а также обладает необычной способностью сигнализировать через одну цепочку гетеродимерного рецептора ИЛ-6 [78, 105]. Таким образом, вирус герпеса 8 типа вызывает

такие заболевания, как В-клеточная лимфома, первичная эффузионная лимфома и многоцентровая болезнь Кастельмана, способствуя при этом клеточной пролиферации и блокируя апоптоз. Вирусный ИЛ-6 также ингибирует противовирусный иммунитет путём блокирования интерферонов I типа, что позволяет ему уклоняться от распознавания иммунной системой [29, 30, 78, 82].

Хотя ИЛ-6 играет защитную роль при многих инфекционных процессах, он также может способствовать хроническому воспалению, в частности, таким заболеваниям как артрит, аутоиммунный энцефаломиелит, многоцентровая болезнь Кастельмана, волчанка и множественная миелома [13, 48, 78, 94, 116, 131, 148]. Показано, что мыши с трансгенной экспрессией ИЛ-6 страдают от множественной миеломы, неврологических расстройств (при гиперэкспрессии ИЛ-6 в центральной нервной системе) легочного фиброза и гипертонии (при экспрессии ИЛ-6 в легких) и плазмоцитоза [26, 42, 78, 155, 157]. Также выявлена связь между активностью ИЛ-6 и развитием опухоли, метастазированием и опухолепосредованными воспалениями [78, 98, 128]. Более того, исследования генома и анализ однонуклеотидных полиморфизмов идентифицировали связь между экспрессией ИЛ-6 и исходом болезни [32, 40, 53, 59, 78, 153].

Для того, чтобы получить доступ к изучению цитокинов и других труднодоступных низкопредставленных белков, необходима в первую очередь тщательная предочистка плазмы или сыворотки крови от высокопредставленных белков. Ранние методы истощения белка включали в себя Cibacron blue – хлортриазиновый краситель с высоким сродством к альбумину [80] и белки A/G, который связываются с иммуноглобулинами. Сорбенты на основе Cibacron blue показали низкую специфичность и неспособность полностью удалять целевые белки. Это является серьезным ограничением: даже если таким способом удаётся избавиться от 90%

альбумина, в пробе присутствует приблизительно 4 мг/мл этого белка, который даже в таком виде остаётся одним из наиболее распространенных белков и может вносить существенные фоновые помехи при дальнейшем анализе [46].

Также коммерчески доступными являются колонки для истощения крови на основе антител – multiple affinity removal system (MARS) (Agilent (Wilmington, DE, США)). MARS «Тор-6» представляет собой ВЭЖХ-колонку, которая эффективно удаляет шесть следующих высокопредставленных белков плазмы: альбумин, трансферрин, гаптоглобин, альфа-1-антитрипсин, IgG и IgA. Однако, антитела, используемые в этих аффинных колонках, являются поликлональными, поэтому их единообразие может варьировать от партии к партии.

Ещё одна существующая на данный момент система предобработки плазмы/сыворотки крови – ProteoPrep-20 (Sigma Aldrich, США). Этот иммуноаффинный носитель связывает и удаляет 20 высокопредставленных белков: альбумин, трансферрин, фибриноген, гаптоглобин, альфа-2-макроглобулин, альфа-1-антитрипсин, компоненты компонента С3, С4, и С1q, иммуноглобулины классов G, M, A и D, аполипопротеин А1, аполипопротеин А2, аполипопротеин В-100, альфа-1-гликопротеин, церулоплазмин, преальбумин и плазминоген. При таком методе очистки удаляются > 98% высокопредставленных белков, однако сохраняется высокая вероятность соудаления диагностически значимых низкопредставленных маркерных биомолекул, которые могут находиться в комплексах с вышеобозначенными белками крови.

Таким образом, наиболее популярные сегодня коммерческие системы, к сожалению, не могут гарантировать сохранение в предобработанном препарате конкретного маркерного антигена. Например, было показано, что удаление альбумина из плазмы крови приводит к неспецифическому

удалению ряда цитокинов из исследуемого образца [61]. Соответственно, необходимо использовать иммуносорбенты для индивидуальных белков, найти которые довольно трудно. Также следует помнить о том, что большинство ныне существующих систем для предобработок образцов крови довольно дороги. Использование комбинаторных иммуносорбентов на основе наноантител могут предоставить возможность недорогой, и при этом специфичной и адаптируемой предобработки крови для конкретного маркерного белка.

1.2.4. Интерференции (фоновые помехи), возникающие при проведении диагностических иммунологических тестов и способы борьбы с ними

Одной из важнейших проблем, которая может возникнуть при анализе образцов плазмы или сыворотки крови — возникновение неспецифических сигналов. Ещё в начале 1970-х годов были описаны ложноположительные результаты в иммунологических тестах на поверхностный антиген вируса гепатита В из-за циркулирующих в крови антител [126]. С момента этой публикации прошло почти 50 лет, однако искажение результатов иммунологических анализов всё ещё является не до конца решённой проблемой.

Что может создавать ложные сигналы в иммунологических тестах? Это [122]:

1. наличие в анализируемом препарате аутоантител;
2. наличие в анализируемом препарате гетерофильных антител;
3. использование заменителей крови;
4. повторное использование одной и той же пробы для последующих анализов;
5. использование специальных пробирок для сбора биологического материала;

6. наличие в пробе примесей и посторонних веществ;
7. использование контрастных веществ;
8. наличие в препарате белков системы комплемента, фибрина, парапротеинов (белков с аномальной структурой);
9. перекрёстная реактивность;
10. присутствие остатков лекарств (в том числе растительного происхождения) и их метаболитов, радиоактивных препаратов;
11. гемолиз;
12. эффект «сползания» - десорбция иммобилизованного антигена с подложки при резком увеличении его концентрации;
13. наличие в препарате иммунных комплексов;
14. липемия - повышенное содержание в крови нейтральных жиров и триглицеридов;
15. наличие в препарате микросгустков;
16. недостаточный объём образца, его неправильное хранение.

Например, ложные сигналы могут создавать так называемые гетерофильные антитела [122]. Это обладающие слабой активностью и мультиспецифичностью антитела, продуцируемые против неопределённых антигенов. Считается, что гетерофильные антитела могут связываться с антителами подложки и детекции, но не могут конкурировать за связывание с высокоаффинными антигенами (рисунок 3). Однако в 2011 году были обнаружены высокоспецифичные гетерофильные антитела, обладающие высоким сродством к Fc-фрагменту мышиных IgG1-антител (данный изотип антител чаще всего используется в иммуноанализах).



Рисунок 3 – Наличие гетерофильных антител в организме пациента способствует появлению ложных результатов при постановке диагностического иммуноферментного анализа, поскольку такие антитела способны связываться с якорными и/или детектирующими антителами.

Хотя технологии иммуноанализа уже более 50 лет, чувствительность и специфичность этого подхода редко сравнивается с другими аналитическими методами. В формате сэндвич-анализа иммобилизованное антитело связывает аналит (антиген) из образца, тогда как детектирующее антитело, сшитое с сигнальной меткой, связывается с другим эпитопом того же антигена. После тщательной промывки сигнал измеряется и сравнивается со стандартной кривой для определения концентрации аналита. В случае, если гетерофильные антитела из исследуемого образца пациента перекрестно связывают аналитические антитела, возникают ложные сигналы [23]. Влияние гетерофильных антител может провоцировать возникновение ложных результатов даже при проведении конкурентных анализов, когда антиген с неизвестной концентрацией из исследуемого образца конкурирует с добавленным меченым антигеном известной концентрации. Однако частота ложных сигналов, создаваемых гетерофильными антителами в таких анализах, относительно невысока, в отличие от более распространенной проблемы перекрестных реакций эндо- или экзогенных молекул [41, 86]. В клинической практике конкурентные анализы зачастую используются для

измерения концентраций небольших пептидов, таких как стероидные гормоны и гормоны щитовидной железы.

Также ложные результаты в иммунологических тестах могут давать так называемые ревматоидные факторы. Они были открыты в 1940 году, и представляют из себя антитела пациента (обычно иммуноглобулины класса M), обладающих высоким сродством к Fc-фрагменту собственных IgG пациента. Такие антитела обнаруживаются у 5–10% населения и у 70% пациентов, страдающих ревматоидным артритом [115]. Ревматоидные факторы имеют много общего с гетерофильными антителами. Уже выдвигались предположения, что и тот, и другой тип антител имеют общее иммунологическое происхождение [110]. Ревматоидные факторы традиционно воспринимаются как низкоаффинные антитела, обладающие мультиспецифичностью, но, как и в случае с гетерофильными антителами, из этого правила существуют исключения.

Какие методы можно использовать, чтобы выявить наличие «помех», созданных гетерофильными антителами (рисунок 4)?

1. Повторный анализ. Если в ходе иммунологического тестирования были получены предположительно недостоверные результаты, то образец необходимо проанализировать тем же самым методом, для исключения аналитических ошибок (недостаточная или неэффективная отмывка, погрешности пипетки, наличие примесей и т.д.) [156]. Зачастую широкий разброс результатов, полученных в ходе проведения идентичных экспериментов, говорит о наличии в исследуемом образце гетерофильных антител. Тем не менее, отсутствие изменений при повторном тестировании не исключает наличия ложного результата.

2. Повторный анализ с использованием иного иммунологического метода или применение альтернативной методологии. Обычно образец повторно анализируется в другой лаборатории, которая использует другой

набор для ИФА. Особенно сложные аналитические образцы могут давать ложные сигналы в обоих анализах, но даже в этих случаях сигналы, генерируемые интерферирующими антителами, зачастую различаются. Такой подход доступен для большинства лабораторий и может быть очень информативным, тогда как использование альтернативных методик не всегда представляется возможным. Минус этого подхода состоит в том, что не всегда представляется возможным осуществить транспортировку некоторых анализируемых образцов ввиду их нестабильности.

3. Повторный анализ разведённых образцов, в случае повышенного уровня сигнала. Однако интерпретация результатов, полученных после анализа разведенных проб, может быть затруднена. Некоторые образцы, содержащие гетерофильные антитела, дают линейные ответы при разведении, что может дать ложное подтверждение первоначальному результату. Некоторые препараты не дают линейных ответов при разведении, что также может привести к подтверждению ложного диагноза.

4. Блокировка. Добавление нецелевого антитела животного к исследуемому образцу перед повторным анализом – распространённый подход для нейтрализации интерферирующих антител. Если к исследуемому образцу, содержащему гетерофильные антитела, которые связывают, например, мышиный IgG1, добавить это антитело, то можно нейтрализовать интерферирующие антитела и предотвратить возникновение ложных результатов. При этом следует помнить, что агрегированные в результате теплового или химического воздействия антитела являются более сильнодействующими блокаторами, чем неагрегированные [20, 106]. Скорее всего, это объясняется тем, что агрегаты антител образуют более стабильные комплексы с гетерофильными антителами. Если, например, гетерофильное антитело имеет высокое сродство к Fc-фрагменту мышинных антител, агрегат таких антител с большим количеством Fc-фрагментов, расположенных близко друг к другу, представляет собой более эффективную мишень для

гетерофильного антитела. Как правило, образец и блокирующий агент инкубируют в течение 10–15 мин перед повторным анализом, чтобы обеспечить полное связывание гетерофильных антител с агрегатами. Если в качестве антител подложки и детекции используются, например, поликлональные антитела кролика или козы следует добавлять поликлональные IgG этих животных к исследуемому образцу. Если в ИФА используются антитела двух видов, например, моноклональное мышинное антителом в качестве антитела подложки, а поликлональное антитело кролика или козы в качестве антитела детекции, то такую систему сложно заблокировать. В таком случае в качестве блокаторов используют агрегированные антитела, сходные с детектирующими антителами [21].

5. Истощение или полное удаление гетерофильных антител из образца. В основном для этого используются следующие подходы: преципитация (осаждение) иммуноглобулинов, аффинная экстракция или удаление белков заданного размера путём ультрацентрифугирования. Уровень истинного сигнала в образце можно измерить в случае эффективного удаления из пробы интерферирующих антител. Также можно измерять уровень сигнала элюированных антител с целью оценки фона, вносимого ими в исследуемый образец. С целью правильной интерпретации полученных результатов, в опыт необходимо вводить контрольный образец, который должен тестироваться параллельно. Гипотетически, в качестве агентов для удаления гетерофильных антител из образца можно использовать новые иммуносорбенты на основе однодоменных антител, специфически связывающихся с соответствующими молекулами.

6. Анализы на интерференцию, непосредственное измерение гетерофильных антител. Такие анализы (иногда их ещё называют нечувствительными, non sense) специально предназначены для того, чтобы измерить только фон, вызванный гетерофильными антителами, способными перекрестно связываться с антителами подложки или детекции [24].

Антитела, используемые для этого анализа, распознают два разных белка. Соответственно, белка с такими эпитопами, которые могла бы одновременно распознать пара таких антител, не существует. Большинство коммерческих антител для такого подхода комбинируют в себе два мышиных моноклональных антитела IgG1. Например, можно использовать мышиные IgG1 против карциноэмбрионального антигена (КЭА) в качестве антител подложки и мышиные IgG1 против альфа-фетопротеина (АФП) в качестве антител детекции [22]. Поскольку белков, которые содержат как КЭА-эпитоп, так и АФП-эпитоп, не существует, сигналы в таком анализе вызываются, как правило, связыванием с используемыми антителами гетерофильных антител. Также было показано, что использование только Fab-фрагментов антител или биотинилированных одноцепочечных антител (scFv) в качестве антител подложки снижает частоту интерференций, связанных с гетерофильными антителами [168]. Однако использование фрагментов антител увеличивает производственные расходы на такой анализ. В результате процедур расщепления и очистки происходит потеря конечного продукта, которая может достигать 20–30%. Это является проблемой для отрасли иммунологического анализа. Поскольку производство коммерческих антител, используемых в ИФА, обычно составляет большую часть общего производственного бюджета в отрасли иммунологических анализов, то подобные потери существенно сказываются на экономической эффективности процесса. Однако, несмотря на дополнительные расходы, большинство компаний всё же используют фрагменты антител при разработке своих тестов [22, 122]. Возможно, небольшие однодоменные антитела также являются перспективными кандидатами для этих целей: их наработка экономически эффективна, а способность связываться с необычными эпитопами крайне высока.

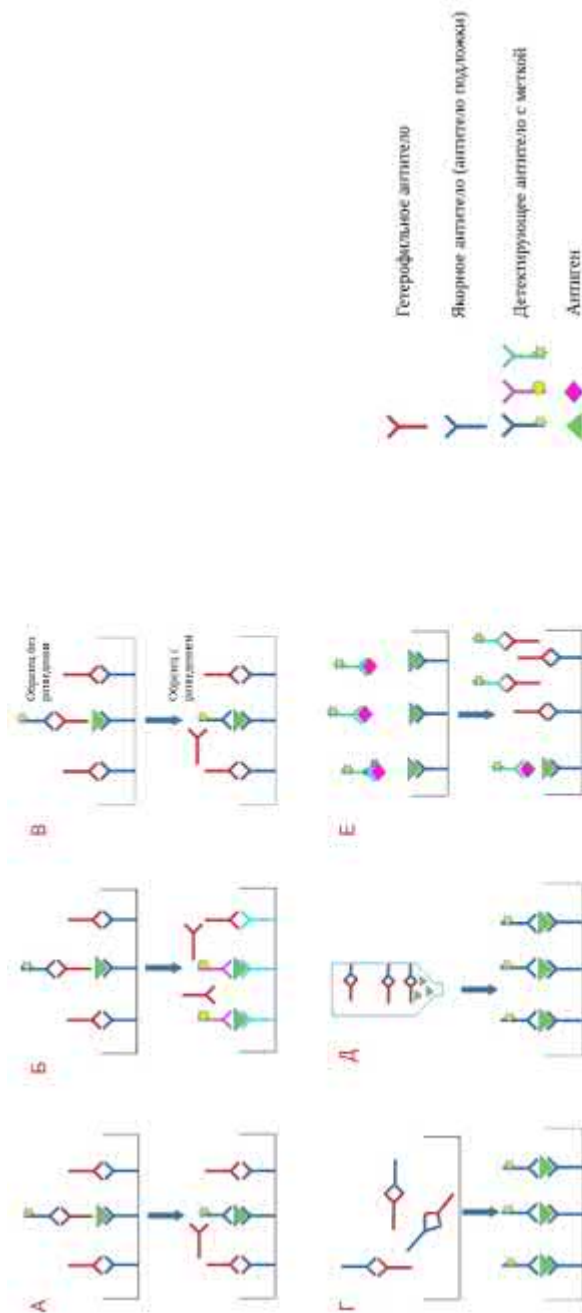


Рисунок 4. Методы, применяемые для детекции гетерофильных антител и стратегии для их удаления из анализируемого образца. А - Повторный анализ образца позволяет минимизировать риск ошибки и установить возможное присутствие в пробе гетерофильных антител; Б - Повторный анализ с применением много иммунологического метода или использование альтернативной методологии; В - Повторный анализ разведённого образца; Г - Добавление нецелевого антитела к исследуемому образцу перед повторным анализом обеспечивает связывание гетерофильных антител с этими нецелевыми белками, что повышает вероятность получения достоверных результатов; Д - Удаление (или частичное истощение) гетерофильных антител из образца повышает вероятность получения достоверных результатов; Е - использование якорных и детектирующих антител, связывающих различные антигены. Возникающий при таком анализе сигнал будет связан с наличием в анализируемом образце гетерофильных антител.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Оборудование

В работе использовалось следующее оборудование: центрифуги Allegra X-15 R (Beckman coulter, США), minispin, 5415R, 5702 R, 5415 D, 5810R (Eppendorf, Германия); Камеры для горизонтального гель-электрофореза SUB-CELL GT, SUB-CELL MODEL 96, WIDE MINI SUB-CELL GT (Bio-rad, США); Камеры для вертикального гель-электрофореза (Bio-rad, США); Спектрофотометр BioPhotometer (Eppendorf, Германия); Микропланшетный фотометр Microplate Reader Mul-tiscan EX (Labsystems. США); Амплификаторы Mastercycler gradient (Eppendorf, Германия) и T-personal (Biometra, Германия); медицинский ротационный смеситель Rotamix RM-1 (ELMI, Латвия) для перемешивания жидкостей в обычных и вакуумных пробирках (0,5-50 мл); Вортекс Reax top (Heidolph, Германия); Термостат Гном (ДНК-технология, Россия); Автоматические дозаторы Gilson (Франция) и наконечники для добавления небольших (микролитровых) объёмов растворов; Термостат суховоздушный электрический ТС-1/80 СПУ (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия); Термостатические стационарные качалки Excella E24R и Excella E25; pH-метр MP220 (Mettler Toledo, США); Стерилизатор сухожаровой Binder ED53 (Binder, Германия); Система тонкой очистки воды Simpак 1 (Merck Millipore, США); Система гель-документации Biometra BioDocAnalyze (Biometra, Германия).

2. Антитела

Использовали коммерчески доступные антитела к гемагглютининовому тэгу (ИМТЕК, Россия).

3. Ферменты

Рестриктазы BamHI, MspI, HindIII, NotI, KpnI, NcoI, EcoRI, SalI, XhoI (Fermentas (Thermo Fischer Scientific), США), ДНК-лигаза бактериофага T4 (Fermentas (Thermo Fischer Scientific), США), ревертаза RevertAid™ MMuLV, Taq и Pfu ДНК-полимеразы; (Silex, Россия), Эндоуклеазы MspAI (SybEnzyme, Россия), Hinf и RSA (Fermentas (Thermo Fischer Scientific), США).

4. Бактериальные среды

Для выращивания применяемых в данной работе штаммов *E.coli* использовался следующий ряд сред и антибиотиков:

Luria-Bertani (LB). 1 литр: бактотриптон – 10 г; дрожжевой экстракт – 5 г; хлорид натрия – 10 г. Автоклавирование 1,25 атм, 20 минут.

2×YT. 1 литр: бактотриптон – 16 г; дрожжевой экстракт – 10 г; хлорид натрия – 5 г. Автоклавирование 1,25 атм, 20 минут.

Terrific Broth (TB). 1 литр: бактотриптон – 12 г; дрожжевой экстракт – 24 г; глицерин – 4 мл (5 гр) в объеме 900 мл. Автоклавирование 1,25 атм, 20 минут. После автоклавирования добавляется 100 мл стерильного раствора фосфатов калия, содержащего: 0,17 М KH_2PO_4 , : 0,72 М K_2HPO_4

SOB. 1 литр: : бактотриптон – 20 г; дрожжевой экстракт – 5 г; 5М NaCl – 2 мл; 1М KCl – 2,5 мл; 1М MgCl_2 – 10 мл; 1М MgSO_4 – 10 мл. Автоклавирование 1,25 атм, 45 минут.

Антибиотики. Ампициллин (AppliChem). Концентрация стокового раствора — 100 мг/мл. Готовится в 50% этаноле и хранится при -20°C. Рабочая концентрация 50-100 мкг/мл.

Канамицин (AppliChem). Концентрация стокового раствора — 70 мг/мл. Готовится в воде и хранится при -20°C. Рабочая концентрация 30-70 мкг/мл.

5. Методы, использованные в работе с верблюдом

5.1. Иммунизация верблюда и получение библиотеки последовательностей наноантител

Самец и самка верблюда (*Camelus Bactrianus*), которые использовались для иммунизации, содержатся на научно-экспериментальной базе «Черноголовка» Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН.

Для получения однодоменных антител, специфически узнающих F4/80, в качестве антигена использовался рекомбинантный белок F4/80: для этого коллегами из лаборатории молекулярных механизмов иммунитета Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН клонировали внеклеточную часть белка F4/80, которую затем экспрессировали в эукариотической системе [5, 6, 47]. Для получения однодоменных антител, специфически узнающих белки плазмы крови использовалась плазма периферической крови здоровых доноров, предоставленная Медицинским радиологическим научным центром им. А.Ф. Цыба – филиалом ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России.

Иммунизации проводили по описанным ранее методикам [3, 6].

Чтобы получить преимунную сыворотку, перед первым этапом иммунизации от верблюда отбирали несколько миллилитров крови, которую как отрицательный контроль использовали в дальнейших экспериментах. Через 4 недели после проведения первой иммунизации делали вторую инъекцию, а последующие три инъекции антигеном проводили с интервалом в 10 дней. Через 5 дней после последнего этапа иммунизации проводили отбор крови животного. С целью предотвращения образования кровяного сгустка свежесобранную кровь верблюда разбавляли 50-ю мл фосфатного

физиологического раствора (PBS), с добавлением ЭДТА (2 мМ) (Gibco, «Invitrogen», США) и гепарина (50 ед./мл) (Sigma Aldrich, США).

Клонирование (получение библиотеки однодоменных антител) проводили по стандартным протоколам [14, 33, 113, 142].

6. Работа с фаговыми библиотеками

Процедуры работы с бактериями и бактериофагом M13 проводили по описанным ранее протоколам [1, 2, 16, 143, 145].

6.1. Приготовление компетентных клеток линии *E.coli*

Приготовление компетентных клеток проводили по ранее описанному протоколу [145]. Штаммы *E.coli*, которые использовались в данной работе для приготовления компетентных клеток: TG1 (Stratagene, США), WK6 [173], XL-1 или BL-21. Данные штаммы были любезно предоставлены проф. С. Муйлдермансом (S. Muyldermans, Vrije universiteit Brussel, Belgium). Стоковые растворы бактериальных клеток хранились в 60% растворе глицерина при -70°C. Перед приготовлением компетентных клеток часть стокового раствора рассеивалась петлёй (методом истощающего штриха) на чашку с селективным LB-агаром. После роста колоний в течение 16 часов в термостате при 37°C, единичную колонию переносили в 25 мл жидкой среды LB и наращивали в термостатированной стационарной качалке при 37°C, 180 об/мин в течение дня. Затем 1 мл подрощенных клеток переносили в две 250-миллилитровые колбы, каждая из которых содержала по 100 мл среды SOB. Культуры клеток растили до плотности 0,4 (измерение при длине волны 600 нм) в течение ночи при температуре 26°C. Полученные культуры клеток в течение 15 минут охлаждали в ледяной бане (+4°C). После этого культуры из обеих колб центрифугировали при 2500 об/мин, +4°C в течение 10 минут. Все последующие манипуляции с клетками проводили с использованием ледяной бани. Полученные осадки ресуспендировали в 80 мл INOE-буфера, после

чего центрифугировали при 2500 об/мин, +4°C в течение 10 минут. Супернатант удаляли, а бактериальный осадок ресуспендировали в 20 мл INOE-буфере. Добавляли 750 мкл раствора диметилсульфоксида (PanReas AppliChem, Германия), перемешивали, давали постоять клеткам 3 минуты во льду. Далее разносили суспензию клеток по 300 мкл в заранее подготовленные подписанные 1,5 мл пробирки. Пробирки с клетками сразу же помещали в термос с жидким азотом. Полученные клетки хранили при -80°C.

Компетентность клеток оценивали трансформацией плазмидой с известной концентрации (1 нг на трансформацию). В качестве контроля на загрязнение компетентных клеток чужеродной плазмидной ДНК, проводили трансформацию клеток без добавления плазмиды. Компетентность клеток обычно составляла $2-5 \cdot 10^6$ кл/μг ДНК [2].

Растворы:

INOE-буфер:

Реагент	Количество на литр	Конечная концентрация
MnCl ₂	10,88 г	55мМ
CaCl ₂	2,20 г	15мМ
KCl	18,65 г	250мМ
PIPES (0,5M, pH 6.7)	20 мл	10мМ
H ₂ O	до 1 л	

6.2. 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. Вариабельный домены однодоменных антител были амплифицированы парой праймеров, комплементарных экзону CH2 домена антитела и лидерной последовательности. После этого ПЦР продукт, соответствующий размеру VHH (~650кДа) амплифицировали повторно, используя отжигающиеся по краям VH фрагмента праймеры. Продукты амплификации клонировали по сайтам NcoI (PstI) и NotI в фагмидный вектор pHEN4 [12], любезно предоставленный проф. Муйлдермансом (S. Muyldermans, Vrije universiteit Brussel, Belgium). Клонирование проводили по стандартным методикам [14, 65, 137, 142, 144]. 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 (PanReas AppliChem, Германия) при -80°C.

6.3. Амплификация фаговых частиц

Полученный сток бактерий, содержащих фагмиду pHEN4, высевали в 300 мл среды 2×YT, содержащей ампициллин и глюкозу (Sigma Aldrich, США), с целью амплификации фаговых частиц. 1% глюкоза необходима для ингибирования экспрессии гена pIII, 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), [167]. 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, 200об/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, 30 минут отделяли преципитированный фаг, который ресуспендировали в PBS.

6.4. Селекция библиотеки

Селекцию библиотеки проводили в основном как описано ранее, с небольшими модификациями [14, 33, 113, 142].

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 бычьего сывороточного альбумина (BCA) (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 час при комнатной температуре. Многократной промывкой PBS и PBS с 0,05% Tween-20 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 ампликации 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 ([167], New England Biolabs, США). 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 [10, 33, 142]. В препаративных количествах нарабатывали периплазматический экстракт, содержащий VNN с последовательностью гемагглютининового тэга (НА-тэг) на С-конце, которая необходима для специфической детекции получаемого белка с помощью соответствующих коммерческих антител. Подробная методика получения периплазматического экстракта описана в пункте 7.3. Коммерческие анти-НА-моноклональные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, использовали в качестве вторичных антител к НА-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 405нм измеряли оптическую плотность.

Растворы:

TEA: 1,4% триэтиламин pH 1,0, растворённый в воде.

PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄

PBST: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄,
Tween-20 0,05%

ABTS substrate solution: 2.2 г/л ABTS, 50 mM лимонная кислота pH 4.0,
0,06% H₂O₂

6.5. Полимеразная цепная реакция

Стандартные реакции проводили в объёме 15-30 мкл. Состав реакционной смеси: ДНК (до 10 нг, либо ДНК единичной колонии при проведении ПЦР с колонии), 1xПЦР буфер с добавлением 1.5 mM MgCl₂, прямой (forward) и обратный (reverse) праймеры (по 1 pM), dNTP (по 0,2mM каждого из 4-х), смесь Taq:Pfu ДНК – полимераз в соотношении 50:1 (1 ед.), H₂O (mQ).

Условия реакции:

1) Денатурация — 94°C, 30 секунд.

2) Отжиг праймеров (для каждой пары праймеров подбирается индивидуальная температура) - 30 секунд, 30 циклов.

3) Элонгация — 72°C, 40-120 секунд (время варьируется в зависимости от размера фрагмента, который амплифицируется).

По окончании реакции смесь охлаждали до 10°C.

6.6. Фингерпринтный анализ отобранных вариантов однодоменных антител

Вначале проводили амплификацию нуклеотидных последовательностей V_HN с помощью ПЦР, используя ДНК-материал единичных колоний. Стандартную реакцию проводили в объеме 15 мкл, для амплификации индивидуальной последовательности однодоменного антитела использовались прямой праймер rP (5'-сасасaggaaасagctatgас-3') и обратный праймер GП (5'-ссасаgасagccctcatag-3').

С помощью электрофореза в агарозном геле проводился анализ полученных в результате амплификации фрагментов ДНК. В случае, если размер фрагмента был ожидаемым (около 650 пар оснований), данный ПЦР-продукт параллельно обрабатывался тремя частотщепящими 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, H₂O (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% 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).

6.7. Минипрепаративное выделение плазмидной ДНК

Отобранные в результате вышеописанных этапов селекции единичные клоны растили на чашке с ампициллином. Единичную колонию высевали в 3 мл среды LB с добавлением ампициллина, пробирку помещали в термостатированную стационарную качалку и подрачивали при 37°C, 180 об/мин в среднем 16 часов. Затем выросшую культуру центрифугировали 10 минут при 3000 g. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 200 мкл лизирующего буфера. Пробирки держали 10 минут при комнатной температуре. По истечении этого времени добавляли по 400 мкл денатурирующего буфера, и инкубировали пробирки 5 минут в ледяной бане (+4°C). Затем добавляли 310 мкл 7,5 М ацетата аммония (pH 7.6). Пробирки оставляли на 5-30 минут в ледяной бане, после чего центрифугировали при 12000g 10 минут. Тщательно отбирали супернатант, не касаясь осадка, который переносили в новую пробирку, содержащую 0,6 V изопропанола (Panreac AppliChem, Германия). Содержимое перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 30 минут, после чего центрифугировали 10 минут при 12000 g. Изопропанол отбирали, а к осадкам добавляли 100 мкл 2 М ацетата аммония (pH 7.6). Пробирки держали на льду в течение 5 минут, после чего центрифугировали 5 минут при 12000 g. Супернатант переносили в пробирки с равным объёмом (100 мкл) изопропанола и оставляли на 10 минут при комнатной температуре. Затем пробирки центрифугировали в течение 10 минут при 12000 g. Изопропанол удаляли, а осадок промывали в 96% этаноле (~ 200 мкл). После этого пробирки центрифугировали в течение

5 минут при 12000 g. Этанол отбирали, осадок слегка подсушивали. Финально к осадку добавляли 20-100 мкл T₁₀E₁ буфера, pH 8.0 (объём добавляемого раствора зависит от количества видимого осадка и ожидаемого количества полученной плазмидной ДНК). С целью оценки количеств полученной плазмидной ДНК, аликвоты полученных образцов (1-2 мкл) анализировали в горизонтальном гель-электрофорезе. Концентрацию определяли сравнением с маркёром GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fischer Scientific, США), содержащим известное количество ДНК в каждой полосе.

Растворы:

Лизирующий: 50 mM глюкоза, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM ЭДТА.

Денатурирующий: 0,2 M гидроксид натрия; 1% додецилсульфат натрия.

T₁₀E₁ (Tris-EDTA) буфер, pH 8.0: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM ЭДТА.

6.8. Определение концентрации нуклеиновых кислот

Концентрацию определяли методом горизонтального гель-электрофореза в 1,5% геле сравнением с маркёром, содержащим известное количество ДНК в каждой полосе. Такой подход позволяет оценить не только количество, но и качество выделенной ДНК, например, наличие в препарате примесей РНК. После этого проводили точные количественные спектрофотометрические измерения при 260 нм.

6.9. Горизонтальный гель-электрофорез

Для проведения горизонтального электрофореза использовали 0.5-3% агарозный гель (концентрация агарозы зависит от размера разделяемых фрагментов). Разделение проводили в горизонтальной камере (Bio-Rad, США) в 1x TAE-буфере, источник питания Эльф-4 (ДНК-технология). В агарозный гель и в используемый TAE-буфер добавляли бромистый этидий (до конечной концентрации 0,5 мкг/мл) для последующей визуализации

ДНК. К анализируемым образцам ДНК добавляли соответствующее количество 6-кратной краски для нанесения на электрофорез. Маркер для контроля и определения размеров анализируемых ДНК-образцов подбирался индивидуально. Анализ полученных фрагментов проводили при помощи цифровой камеры Biometra в ультрафиолетовом свете.

Растворы:

ТАЕ (1х): 40 мМ Tris-ацетат (pH 8,0), 1 мМ ЭДТА (pH 8,0), 20 мМ СН₃СООН.

Состав краски, добавляемой к ДНК перед нанесением материала ДНК на гель–электрофорез (6х): 0,1% бромфеноловый синий, 0,1% ксиленцианол, 10 мМ ЭДТА (pH 8,0), 60% глицерол.

Бромистый этидий: порошок бромистого этидия растворить в воде до конечной концентрации 10 мг/мл, полное растворение происходит при качании на 220 об/мин при 37°C в течение 5 часов. Концентрация 0,5 мкг/мл оптимальна для окрашивания фрагментов ДНК.

7. Продукция и очистка рекомбинантных однодоменных антител

7.1. Получение экспрессионного вектора

С целью получения экспрессионного вектора к 3'-концу последовательности однодоменного антитела добавляли вставку, содержащую полигистидиновый (гексагистидиновый, His₆) тэг. Для этого проводили рестрицирование фагмиды pHEN4 по сайтам EcoRI и BstEII (в случае наличия множественных сайтов рестрикции, фагмиду рестрицировали по другим сайтам, в каждом конкретном «нестандартном» случае рестриктазы подбирались индивидуально). Состав рестрикционной смеси: ДНК, 1хбуфер, оптимальный для используемого фермента, 1-5 ед. рестриктаз(-ы) (количество используемого фермента зависит от количества рестрицируемой ДНК и ожидаемого качества рестрикции), H₂O (mQ). В течение 1-2 часов смесь инкубировали в термостате при 37°C. Инактивацию проводили

нагреванием смеси в течение 20 минут при 65°C. Методом горизонтального гель-электрофореза анализировали продукты реакции. При постановке анализа с несколькими ферментами, в случае возможности оптимальной работы всех используемых рестриктаз в одном буфере, рестрикцию проводили одновременно. Если буфер не мог обеспечить удовлетворительную работу всем используемым рестриктазам, реакцию проводили следующим образом: вначале осуществляли постановку первой реакции в низкосолевого буфере, а затем полученную смесь разбавляли буфером для последующей рестрикции в 3-5 раз. 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.

7.2. Трансформация бактериальных клеток

Компетентные клетки размораживали в ледяной бане (+4°C). Для одного варианта трансформации использовали 30-50 мкл суспензии клеток, к которым добавляли 1-5 мкл лигазной смеси или 0,01 мкг плазмидной ДНК. Клетки с добавленным материалом инкубировали в ледяной бане в течение 30 минут. После этого пробирку помещали в заранее нагретый до 42°C термостат (стадия теплового шока). По истечении 90 секунд пробирку возвращали в ледяную баню на 5-15 минут, после чего добавляли 800 мкл среды SOB или LB и инкубировали клетки в термостатированной стационарной качалке в течение 40 минут при 37°C, 180 об/мин. Затем клетки высевали в трёх разведениях (1:10, 1:100 и 1:1000) на чашки с LB-агаром и ампициллином. Если клетки трансформировались экспрессионной плазмидной ДНК, в агар дополнительно добавлялась 1/200 доля 20%

глюкозы. Клетки, посеянные на чашки, выращивали при 37°C в течение 16-18 часов. Выросшие клоны проверяли на наличие вставки необходимого размера при помощи ПЦР, отобранные клоны сохраняли в виде плазмидных ДНК (анализ вставки и выделение плазмидной ДНК проводили, как описано в пунктах выше).

7.3. Приготовление периплазматического экстракта

Периплазматический экстракт готовили по стандартным протоколам с небольшими модификациями [143]. 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 ими высокой оптической плотности. После этого культуру клеток пересеивали 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-галактопиранозида (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 3000g В данной работе использовались экспрессионные векторы pHEN4 и pHEN6. 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 течении 20-30 минут при 12000g. Отбирали супернатант, содержащий периплазматический экстракт, к которому добавляли NaCl до конечной концентрации 0,5М. Для наработки однодоменных антител в аналитических (препаративных) количества 20 мкл бактериальной суспензии пересевали в планшет, содержащий по 400 мкл среды 2хYT и 100 мкг ампициллина в лунке, растили бактериальные клетки до OD₆₀₀ ~ 0,6 в термостатической качалке при 37°C. Затем добавляли в каждую лунку 0,1 М ИПТГ и инкубировали в течение 16-18 часов в термостате при 30°C с перемешиванием. Затем клетки осаждали центрифугированием (30 минут, 4500g). В случае использования экстрактов для последующего ИФА добавляли NaCl до конечной концентрации 0,3М.

Растворы:

TES: 0.5М сахароза, 50 мМ Tris·HCl, pH 8.0, 0,5 мМ EDTA, 10 мМ Имидазол, 1/200 PMSF, 12,8 М β-меркаптоэтанол, 1/500 азида натрия

Раствор «осмотического шока»: 10 мМ 50 мМ Tris·HCl, pH 8.0, 1 мМ MgCl₂

7.4. Очистка белка на Ni-NTA-сефарозе

Очистку белков проводили путём аффинной хроматографии с использованием Ni-NTA агарозы (HIS-Select Nickel Affinity Gel, Sigma-Aldrich, США), следуя протоколу производителя. Подготовленную колонку уравнивали буфером для промывки (лизирующим буфером). Периплазматический экстракт пропускали через сформировавшийся столбик колонки. Затем колонку три раза промывали буфером для промывки

суммарным объёмом 10 объёмов колонки. Элюцию белка, который связался с колонкой благодаря наличию в нём гексагистидинового тэга, проводили добавлением одного объёма колонки элюирующего буфера три раза подряд. Качество и количество белка, содержащегося в полученном элюате, проводили при помощи анализа аликвот в гель-электрофорезе.

Растворы:

Буфер для промывки: 50 мМ NaH_2PO_4 pH 8.0, 0,3 М NaCl , 10 мМ имидазол

Элюирующий буфер: 50 мМ NaH_2PO_4 pH 8.0, 0,3 М NaCl , 250-500 мМ имидазол

7.5. Гель-электрофорез в полиакриламидном геле

По стандартной методике Лэммли [Laemmli, 1970] проводили электрофорез в акриламидном геле. Для оценки количеств наработанных однодоменных наноантител использовался гель плотностью 14%, для анализа плазмы крови и её протеома - градиент плотности геля 5-19%. Для заливки геля и разделения в нём смеси белков с целью получения электрофореграммы использовали прибор MiniProtean II (Bio-Rad, США), источник питания - Эльф-4 (ДНК-Технология). В качестве восстанавливающих агентов использовались либо ДТТ (дителиотриэтол), либо β-меркаптоэтанол. Электрофорез проводили в стандартном SDS-буфере. В зависимости от целей эксперимента и используемого геля контроль разделения молекул проводили с использованием одного из перечисленных белковых маркеров: Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific, США), Precision Plus Protein Dual Color Standarts (BioRad, США), Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США). Перед нанесением образец инкубировался в 2×SB буфере 10 минут при 97°C.

Используемые растворы:

Акриламид:бис-акриламид (30%T, 2.67%C):292 г/л:8 г/л

буферные растворы для заливки геля: 0,5 М Трис-HCl pH 6,8 (концентрирующий гель); 1,5 М Трис-HCl pH 8,8 (разделяющий гель);

SB (2×): 62.5 mM Tris-HCl pH 6,8; 25% глицерин; 2%SDS; 0,01% бромфеноловый синий

SDS-буфер (10×): 2 М Глицин, 0,25 М Tris-base, 1% SDS

7.6. Осаждение белков

По методике Wessel-Fluegge [Wessel, Fluegge, 1984] проводили осаждение белков. Для этого к образцу (150 мкл) при перемешивании добавляли метанол (600 мкл). Затем добавляли хлороформ (150 мкл) и интенсивно перемешивали до формирования одной фазы. Затем добавляли воду (450 мкл), тщательно перемешивали, после чего 1 минуту центрифугировали при максимальных оборотах. Интерфазу, содержащую белок, сохраняли, тогда как органическую верхнюю фазу аккуратно удаляли. Затем добавляли метанол (450 мкл) и тщательно перемешивали. Центрифугировали препарат 2 минуты на максимальных оборотах, после чего супернатант удаляли, а осадок растворяли в PBS.

8. Получение новых иммуносорбентов на основе отобранных однодоменных антител

8.1. Иммобилизация однодоменных антител на CNBr-активированной Сефарозе 4В

Иммобилизацию белков проводили согласно протоколу производителя с небольшими модификациями. Лиофилизованную CNBr-активированную Сефарозу 4В (GE Healthcare Life Sciences, США) промывали в 1 mM HCl, из расчёта 200 мл 1 mM 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 колонки. 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 терминировали добавлением 1М Tris-HCl, pH 8.0 до финальной 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°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°C. Перед каждым использованием колонку промывали 3-5 объёмами PBS.

8.2. Использование полученных иммуносорбентов для специфического связывания/выделения целевых белков крови для их идентификации.

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, дробно промывали 10-ю объёмами солевого буфера PBS. Элюцию связавшегося белка проводили буфером при пониженном pH, что позволяло разрушить комплекс антиген/антитело, но вариабельный домен при этом

оставался на колонке. Для элюции использовали буфер Tris-HCl, pH 2.7, конечный объём элюата составлял 3 объёма колонки. Реакцию нейтрализации проводили путём добавления к элюату раствора 1M Tris. Элюированная фракция анализировалась электрофорезом в градиентном полиакриламидном геле (5-19%), после чего обогащающийся белок вырезался для последующей масс-спектрометрической идентификации.

8.3. Идентификация белков методом масс-спектрометрии.

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) [3].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Оработка методики получения специфических клонов однодоменных антител на примере белка F4/80. Использование полученных клонов антител для детекции рекомбинантного белка F4/80

Основной целью данной работы явилось получение и дальнейшее использование рекомбинантных однодоменных антител (наноантител), специфически связывающихся с белками крови человека. Однако, изначально методы получения и отбора особых верблюжьих антител осваивались автором в ходе получения наноантител к мышинному белку F4/80. F4/80 – это поверхностный белок моноцитов и тканевых макрофагов (в том числе Купефровых клеток печени) мыши. Данный белок широко используется в качестве маркера в проточной цитометрии и иммуногистологии. Отобранные однодоменные антитела, связывающие белок F4/80 использовались нашими коллегами, сотрудниками лаборатории лаборатории молекулярных механизмов иммунитета Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, для проведения дальнейших работ по оценке аффинности белков к антигену с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса и получения биспецифических конструкторов на мышинных и клеточных моделях [5, 6, 47]. В этом разделе будет коротко рассказано о полученных в ходе данной совместной работы результатах.

С целью генерирования однодоменных антител, связывающих белок F4/80, двугорбого верблюда иммунизировали рекомбинантным антигеном, предварительно полученным в эукариотической системе экспрессии. Нарботанный препарат антигена разделяли на 6 частей, каждая из которых содержала по 0,5 мг рекомбинантного белка F4/80. Пять частей использовались для последовательных подкожных инъекций животного, одна — для последующих селекций отобранных антител. Непосредственно

перед инъекцией препарат антигена смешивали с равным объемом адьюванта (Adjuvant LQ, Gerbu Biotechnik, Германия). Также непосредственно перед началом всего цикла иммунизации проводился забор крови неиммунизированного верблюда с целью получения негативного контроля - преиммунной сыворотки. Для предотвращения свертывания кровь сразу же разводили равным объемом PBS, содержащим гепарин (100 ед./мл.) и ЭДТА (3 мМ). 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.

Через 5 дней после завершения иммунизации проводили забор крови из яремной вены верблюда. Разбавленный раствор крови использовали для выделения моноклеарной фракции клеток (лимфоцитов и моноцитов) путём центрифугирования в градиенте фикола (Histopaque-1077, Sigma Aldrich, США). Выделение тотальной РНК из отобранной фракции клеток (в частности, из В-лимфоцитов) проводили при помощи TRIzol Reagent (Invitrogen, США). Выделение поли(А)-содержащей РНК проводили с использованием колонки с олиго(dТ)-целлюлозой. Количество и качество выделенной РНК проверяли при помощи фотометрического анализа и агарозном гель-электрофореза выделенной РНК в 1,5% геле с формальдегидом. При помощи праймера onnro(dТ) и обратной транскриптазы НМ-MuLV проводилась реакция обратной транскрипции по стандартному протоколу [144]. Полученные продукты использовали для двухступенчатой полимеразной цепной реакции. Клонирование ПЦР-продуктов в плазмидный вектор рНЕН4 проводили по описанным методикам [65] (рисунок 5). Общая схема технологии получения антиген-специфичных однодоменных антител отражена на рисунке 6.

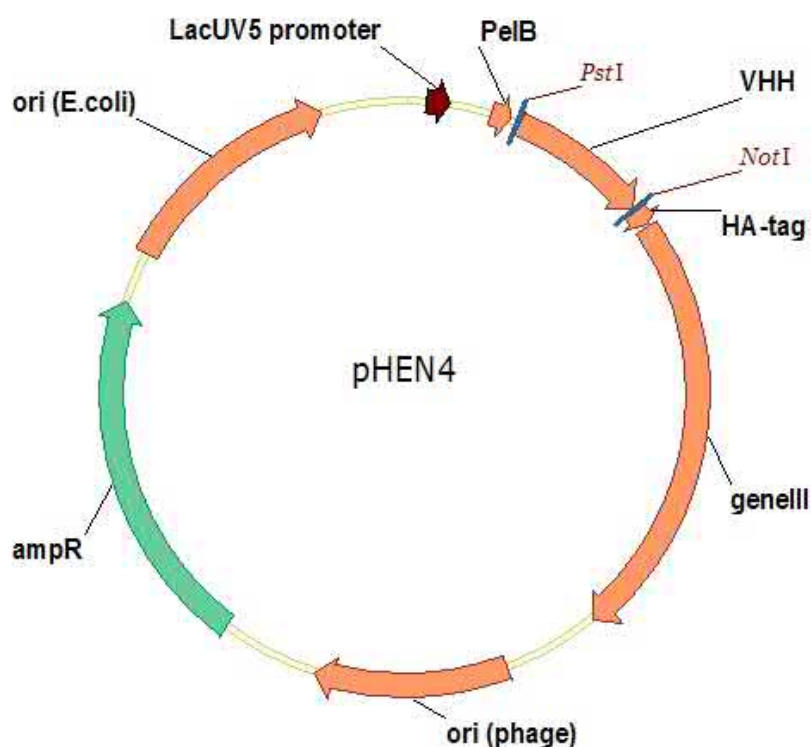


Рисунок 5 – Фагмидный вектор pHEN4. VHH – последовательность однодоменного антитела, HA-tag – последовательность гемагглютининого тага, gene III – последовательность белка GIII, ori – ориджин репликации, ampR – ген устойчивости к ампициллину, LacUV 5 promoter – лактозный промотор.

Селекцию проводили методом модифицированного фагового дисплея, как описано ранее [10]. Всего было проведено 3 раунда селекции, в качестве антигенного материала использовался препарат рекомбинантного белка F4/80. После финального раунда селекции, с целью отбора наиболее специфичных и высокоафинных антител, осуществлялся последовательный анализ индивидуальных вариантов. Было проанализировано 48 клонов однодоменных антител, узнающих поверхностный белок моноцитов и

тканевых макрофагов F4/80. На основании HMR-анализа данные варианты были разделены на несколько групп.

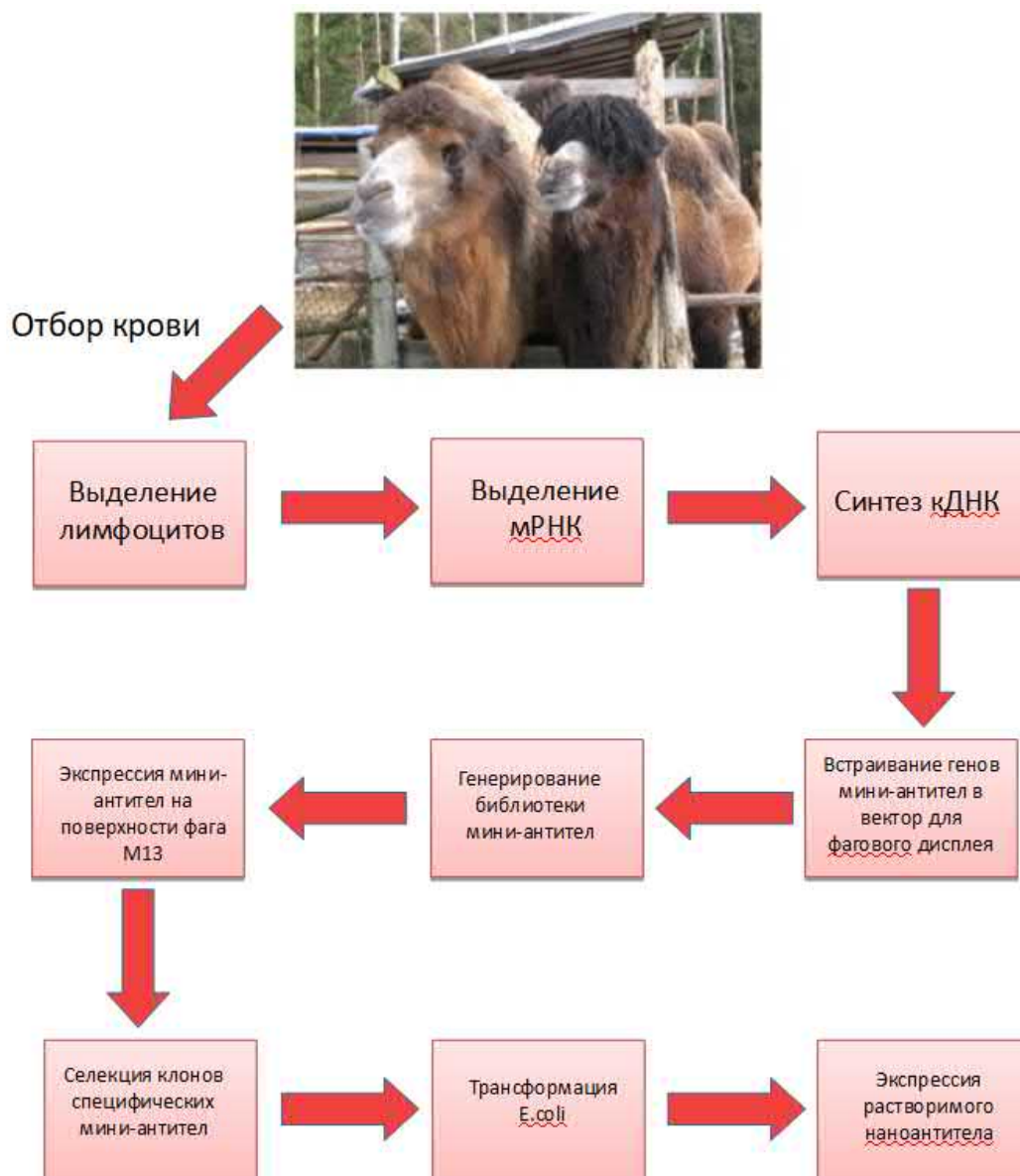


Рисунок 6 – Основные этапы процедуры получения специфических однодоменных антител.

Были определены последовательности кДНК однодоменных наноантител к F4/80. Специфичность и эффективность связывания полученных клонов проводили путём получения периплазматического экстракта, содержащего наноантитело с последовательностью

гемагглютининового тэга (НА-тэга) на С-конце, и его анализа при помощи иммунофлуоресцентного анализа.

В результате проведённого анализа было отобрано 9 клонов наноантител, а также определены их соответствующие аминокислотные последовательности (SEQ ID NO: 1-9), (рисунок 7).

```

SEQ ID NO: 1
malqvqlvesgggsvqsggslrlscagsgyiatadmawfrqapgkerevvatidtdgstya
davkgrftisrdnakttilylqmnsikpedtamyycaagryytlvnlvnyrywgqgtqvtvs
s

SEQ ID NO: 2
malqvqlvesgggsvqigggslklscasghifarcgmgyrqapgkerelvstiasdgtir
yvdsvagrfaisqdkaknttilylqmnsiktdtavyyvvadgysheydvogleqywgqgtqv
tvssa

SEQ ID NO: 3
malqvqlvqlvesgggsvqsggslrlscagsgyirtadmawfrqapgkerevvatidtdgs
tyadavkgrftisrdnakttilylqmnsikpedtamyycaagryytlvnlvnyrywgqgtqv
tvssa

SEQ ID NO: 4
malqvqlvesgggsvqsggslrlscaasanistfdmgwfrqapgkerevvatidsdgstrs
tsyvdsavkgrftisrdnakttilylmnsikpedtamyycaaaryytrlnvlnykywgqgtq
vtvssa

SEQ ID NO: 5
malqvqlvesggglvqpqgslrlscaasgftfssaamswvrqapgkgleyvatitttrgtpi
ysnsvkdrftisrggaksttilylqmdnlkpedtamyycqtslgergqgtqvtvss

SEQ ID NO: 6
malqvqlvesggglvqpqgslrlscaasgftfssydmswwrqapgkgfewvsggissrgdst
gyaaavkgrftisrdnaknttilyqlnsiktedtamyycgkgyggswwplgqgtqvtvssa

SEQ ID NO: 7
malqvqlvesgggsvqsggslrlscaasgyistasgiistadmawfrqapgkerevvatid
sdgststtsyadavkgrftisrdnakttilylqmnsikpedtamyycaaaryytvrvnlvnyr
ywgqgtqvtvssa

SEQ ID NO: 8
malqvqlvesgggsvqaggsiklscvssgytsrlegmdwyrqapgkerelvsttigtgdgth
yadavkgrfaisqdnakntmylqmnklktedtaeyyctvrlmngateaktrmywgqgtqvt
vssa

SEQ ID NO: 9
malqvqlvesgggsvqaggsirlscatsgytyargcmawfrqapgkerewiaviytsdnt
vstnyvdavkgrftisqdnakntvylqmnsikpedtamyycaarpnggctsspnafgywgq
gtqgtvssa

```

Рисунок 7 – Список аминокислотных последовательностей однодоменных антител, специфически распознающих белок F4/80. Жирным шрифтом выделены и подчеркнуты последовательности, соответствующие гипервариабельным участкам CDR1, CDR2 и CDR3 (от N- к С-концу, слева направо).

Последовательности кДНК девяти отобранных клонов наноантител переклонировали в экспрессионный вектор рНЕН6. В результате наличия сигнальной последовательности РelВ на N-конце последовательности

однодоменного антитела, происходит накопление рекомбинантного белка в периплазме бактерий, что обеспечивает возможность его эффективного выделения. Присоединение в результате переклонирования последовательности 6xHis-тэга к С-концу последовательности однодоменного антитела обеспечивает возможность эффективной очистки отобранного наработанного однодоменного антитела на Ni-NTA-агарозной колонке (HIS-Select Nickel Affinity Gel) с помощью металл-хелатной афинной хроматографии (рисунок 8). Полученным вектором, несущим в себе последовательность антитела, трансформировался штамм *E.coli* BL 21. Препарат VHH получали приготовлением ночной культуры бактерий, которую индуцировали для экспрессии белкового продукта добавлением раствора ИПТГ в концентрации 0,2 мМ.

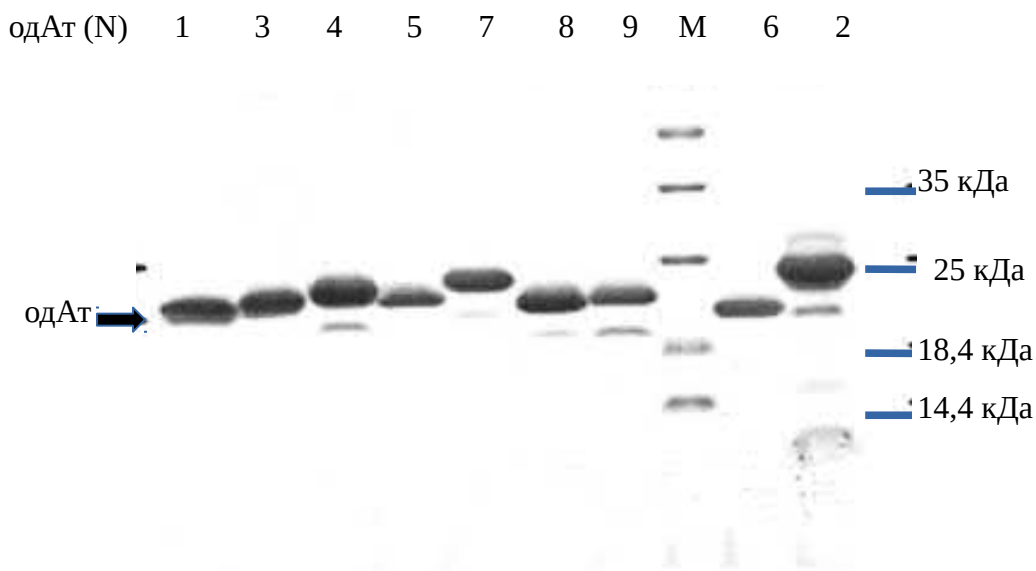


Рисунок 8 – Анализ качества и количества наработанных однодоменных антител, узнающих белок F4/80, методом электрофореза в 14% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Экспрессию белка проводили путем добавления 1мМ ИПТГ к бактериальной культуре, инкубацию клеток проводили при 28°C в течение 16-18 часов. ОдАт — однодоменное антитело, М — маркер Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific, США).

Специфичность и эффективность связывания препарата полученного периплазматического экстракта, содержащего наноантитело с последовательностью гемагглютининового тэга (НА-тэга) на С-конце, анализировали при помощи иммуноферментного анализа (рисунок 9). В ячейки стандартного 96-луночного полистиролового иммунологического планшета (Microlon 600 hi-binding, Greiner bio-one, США) наносили 2 мкг/мл рекомбинантного белка F4/80, разведённого в 50 мкл PBS. Иммобилизацию антигена проводили при +4°C в течение ночи. Затем лунки отмывали раствором PBS, после чего проводили блокировку 1% раствором БСА, растворённым в PBS, при комнатной температуре. Спустя 2 часа лунки отмывали в PBS и PBS с 0,05% Tween-20 (PBT), после чего наносили растворённые в 50 мкл PBS с содержанием 0,1% БСА анализируемые периплазматические экстракты в количестве 500 нг, и оставляли инкубироваться при комнатной температуре в течение 2 часов при перемешивании. После этого лунки планшета отмывали в PBS и PBT, и наносили в разведении в 2000 раз вторичные антитела цыпленка к НА-тагу, конъюгированные с пероксидазой хрена (CHGT-45P-Z, ICL, Inc., USA), растворённые в PBS с добавлением 0.1% БСА. Антитела инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После этого лунки планшета отмывали в PBS и PBT, степень активности фермента пероксидазы хрена определяли с использованием в качестве хромогенного субстрата ABTS. При длине волны 405нм измеряли оптическую плотность. В качестве контроля использовали лунки без добавления антигена, но прошедшие аналогичные стадии дальнейшего анализа параллельно с лунками с добавленным антигеном.

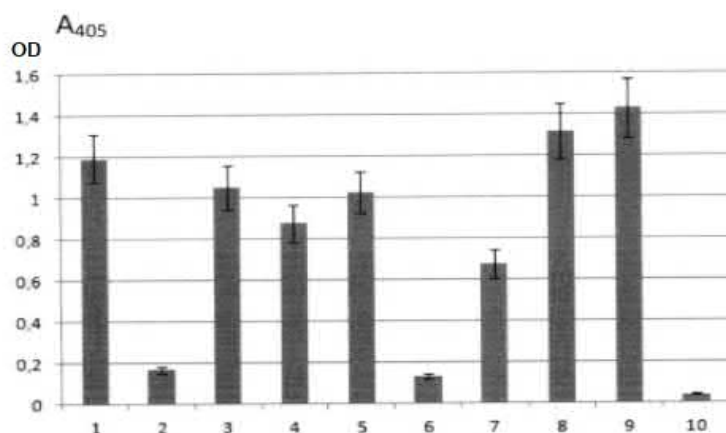


Рисунок 9 – Результаты проверки узнавания отобранными однодоменными антителами рекомбинантного белка F4/80 в иммуноферментном анализе. 1 — 9 — номера отобранных антител. 10 — контрольная лунка без добавления антигена, но блокированная и анализируемая параллельно с образцами 1-9. По оси ординат расположены значения поглощения, измеряемые при длине волны 405 нм. Представлены усредненные результаты проведенного в трёх повторях иммуноферментного анализа (диапазоны разброса полученных значений указаны).

Таким образом, были получены и охарактеризованы девять новых однодоменных антител, специфически связывающих маркерный белок F4/80. В ходе дальнейших экспериментов, проведенных нашими коллегами в лаборатории молекулярных механизмов иммунитета Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН было установлено, что клоны 1, 2, 3, 8 и 9 демонстрировали наибольшую степень связывания с макрофагами мыши, тогда как клоны 4, 5, 6 и 7 практически не связывались с поверхностью этих клеток. Для дальнейших исследований, проводимых нашими коллегами (в том числе для создания биспецифических конструкторов на их основе) были отобраны клоны 1, 2, 3, 8 и 9.

В ходе проведенных экспериментов по получению этих однодоменных антител автором были освоены основные этапы уже много лет развиваемой в лаборатории молекулярных биотехнологий, где выполнялась данная работа,

технологии генерирования, отбора (методом фагового дисплея) и анализа новых вариантов клонов наноантител с заданной специфичностью. Полученный экспериментальный опыт затем применялся для получения наноантител к белкам плазмы крови человека. Подробнее о результатах проведенных экспериментов будет рассказано далее.

2. Разработка и применение метода параллельного генерирования и последовательного отбора клонов однодоменных антител к высокопредставленным белкам крови. Использование полученных на основе отобранных наноантител инструментов для специфического истощения плазмы крови человека и анализ диагностического потенциала полученных истощённых препаратов

2.1. Первая иммунизация верблюда плазмой крови человека

Для проведения иммунизации в качестве антигенного материала, обогащенного высокопредставленными белками, была использована плазма периферической крови от здоровых доноров. Образцы плазмы были предоставлены Медицинским радиологическим научным центром им. А.Ф. Цыба – филиалом ФГБУ “НМИЦ радиологии” Министерства здравоохранения РФ. 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 Biotechnik, США). 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 проведенной

иммунизации была подтверждена с помощью иммуноферментного анализа иммунной сыворотки. Проводился анализ роста титра антител к заданным антигенам по сравнению с неиммунной сывороткой.

2.2. Клонирование всего репертуара кДНК-последовательностей антиген-узнающих доменов (однодоменных антител, VHH) неканонических антител иммунизированного двугорбого верблюда

Клонирование проводили по следующей схеме: выделение РНК из мононуклеарной фракции (лимфоцитов) периферической крови иммунизированного верблюда, синтез кДНК, проведение двухстадийной ПЦР с использованием специфических праймеров, рестрикция и очистка вставок VHH, встраивание генов наноантител в вектор для фагового дисплея, трансформация бактерий (как это было более детально описано выше).

2.3. Последовательный многостадийный отбор клонов однодоменных антител к наиболее представленным и иммуногенным белкам плазмы крови

Селекцию проводили методом модифицированного фагового дисплея. Вначале отбирали те клоны наноантител, которые узнавали самые мажорные 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 [3].

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 [120]. 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 [3]. Также в качестве антигенного материала использовались коммерческие препараты иммуноглобулинов человека IgA, IgG и IgM (“ИМТЕК”, Россия).

В результате первого этапа селекции было отобрано и проанализировано 80 клонов, кодирующих последовательности однодоменных антител. Анализ проводили методом HMR-фингерпринтирования индивидуальных клонов (рисунок 10). В качестве антигена для отбора этих клонов в фаговом дисплее использовались следующие фракции:

1) белки – преципитат с 35% NH_4 -сульфатом аммония. Методом фингерпринтного анализа проанализировано 24 клон.

2) белки – преципитат с 45% NH_4 -сульфатом аммония (после короткой инкубации). Методом фингерпринтного анализа проанализировано 24 клон.

3) белки – преципитат с 45% NH_4 -сульфатом аммония (после долгой инкубации – 3 дня, $+4^\circ\text{C}$). Методом фингерпринтного анализа проанализировано 16 клонов.

4) супернатант, полученный после всех преципитаций. Методом фингерпринтного анализа проанализировано 16 клонов.

Ряд клонов, полученных при отборе на разные фракции антигена, оказались сходными по HMR-фингерпринту: в итоге 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 (рисунок 10).

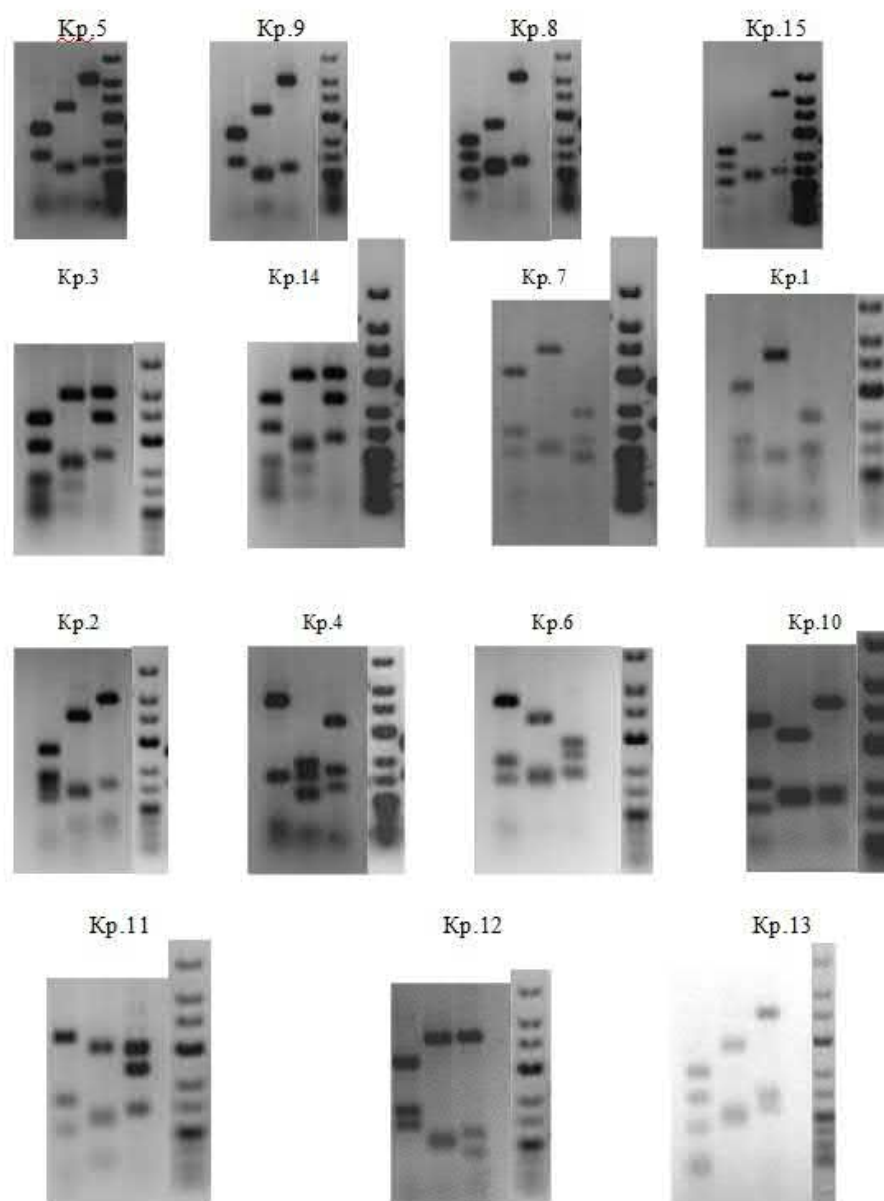


Рисунок 10 – Результаты NMR-фингерпринтного анализа отбираемых после первой селекции клонов наноантител к мажорным белкам крови. Каждый фингерпринт – это электрофореграмма, полученная в результате горизонтального электрофореза в 2,5% агарозном геле фрагментов ДНК, обработанных частотщепящими эндонуклеазами *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). Kp 3 и Kp 14 являются представителями малочисленных групп, а остальные варианты представляют собой клоны с индивидуальным фингерпринтом. Маркер – GeneRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Fischer Scientific, США).

На основании полученных данных из каждой группы отбирали по 1–2 представителя с целью первичного анализа активности и специфичности отобранных клонов в иммуноферментном анализе (таблица 2). Для этого в небольших (аналитических) количествах нарабатывали в периплазме бактерий соответствующие наноантитела. В качестве вторичных антител использовались конъюгированные с пероксидазой моноклональные мышиные 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.

Таблица 2. Клоны, отобранные по результатам фингерпринтного анализа для дальнейшей проверки их активности в иммуноферментном анализе. В правом столбце указан антиген, на который отбирались полученные варианты.

Название	Антиген
Кр.1	Белки, преципитированные с 45% сульфатом аммония (после инкубации с 45% сульф.аммония в теч 3дн.при +4 ⁰ С)
Кр.2	Белки, преципитированные с 35% сульфатом аммония
Кр.3	Белки, преципитированные с 35% сульфатом аммония
Кр.4	Белки, преципитированные с 45% сульфатом аммония (после инкубации с 45% сульф.аммония в теч 3дн.при +4 ⁰ С)
Кр.5	Белки, преципитированные с 45% сульфатом аммония (после инкубации с 45%

	сульф.аммония в теч 3дн.при +4 ⁰ С)
Кр.6	Белки, преципитированные с 35% сульфатом аммония
Кр.7	Белки, преципитированные с 35% сульфатом аммония
Кр.8	Супернатант, полученный после всех преципитаций
Кр.9	Супернатант, полученный после всех преципитаций
Кр.10	Белки, преципитированные с 45% сульфатом аммония (после короткой инкубации)
Кр.11	Супернатант, полученный после всех преципитаций
Кр.12	Белки, преципитированные с 45% сульфатом аммония (после короткой инкубации)
Кр.13	Белки, преципитированные с 45% сульфатом аммония (после короткой инкубации)
Кр.14	Белки, преципитированные с 35% сульфатом аммония (после короткой инкубации)
Кр.15	Белки, преципитированные с 45% сульфатом аммония (после короткой инкубации)

2.3. Получение продуцентов адаптированных однодоменных антител и первичный анализ нарабатываемых однодоменных антител

В результате проведённого иммуноферментного анализа были отобраны первые восемь уникальных клонов наноантител. Последовательности отобранных в результате селекций антител переклонировались в плазмидный вектор рHEN6, 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 11).

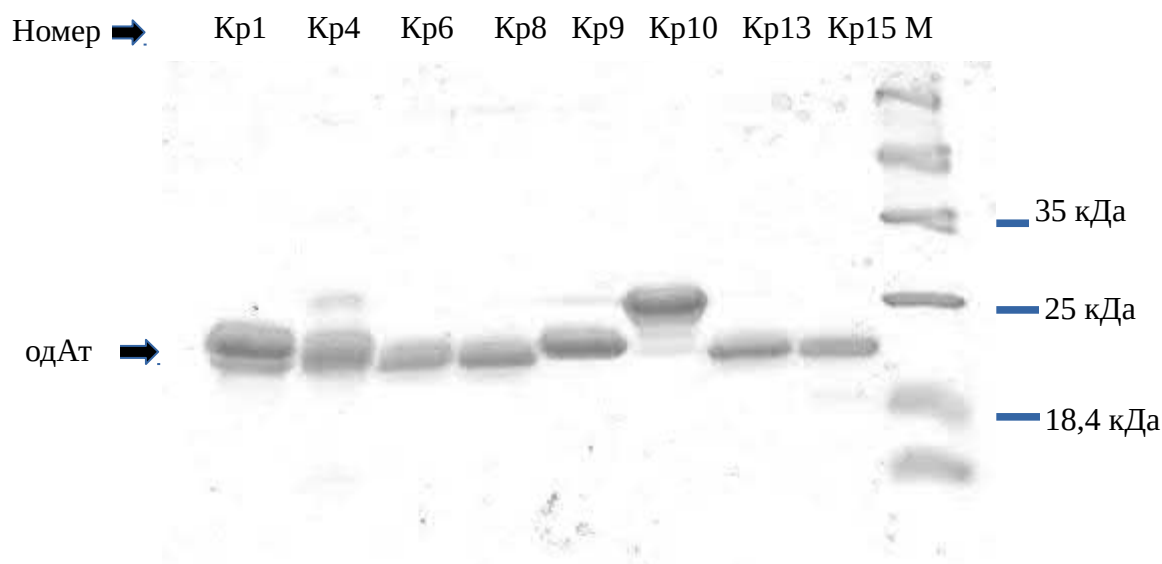


Рисунок 11 — Анализ качества и количества наработанных форматированных однодоменных антител, узнающих белки плазмы крови человека, методом электрофореза в 14% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Экспрессию белка проводили путем добавления 1мМ ИПТГ к бактериальной культуре, инкубацию клеток проводили при 28°C в течение 16-18 часов. ОdАт — однодоменное антитело, М — смесь маркерных белков (Unstained Protein Molecular Weight Marker Thermo Fisher Scientific, США).

3. Использование полученных однодоменных антител в качестве лигандов для новых иммуносорбентов с целью специфической предобработки (истощения) препаратов крови и для выделения целевых белков (и субпротеомов) крови

3.1. Использование полученных иммуносорбентов для специфического связывания/выделения целевых белков крови для их идентификации

Наработанные антитела пришивали к CNBr-активированной Сефарозе 4B (“GE Healthcare Life Sciences”) согласно протоколу производителя. Таким образом было получено восемь новых, уникальных иммуносорбентов. Плазму крови пропускали через полученные колонки, связавшиеся белки элюировали и анализировали в градиентном полиакриламидном геле, а затем проводили идентификацию связавшихся белков методом масс-спектрометрии. Для этого вырезали кусочки геля, соответствующие положению белков, которые передавали в центр коллективного пользования “Протеом человека” Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича” (ИБМХ). Белки подвергались трипсинолизу, данные о массах получаемых пептидов анализировали при помощи времяпролетной лазерной десорбции-ионизации (MALDI-TOF) с использованием системы Mascot [3]. Такому анализу подвергались все белки-мишени, связываемые отобранными в ходе данной работы антителами, о которых будет говориться далее.

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 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 12).

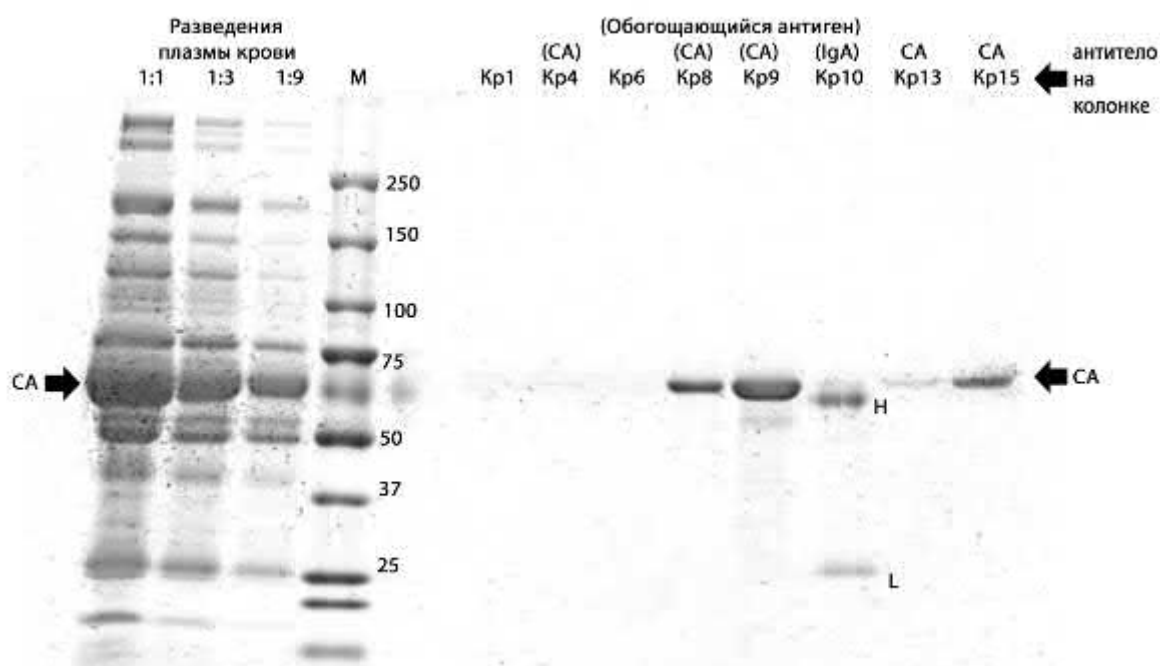


Рисунок 12 – Анализ связывания восьми первых отобранных наноантител (подписаны как Кр1–Кр15) в 5-19% геле в восстанавливающих условиях. Слева нанесена плазма крови человека в трёх разведениях и смесь маркерных белков (Precision Plus Protein Dual Color Standarts, BioRad, США). СА — сывороточный альбумин, IgA – иммуноглобулин А.

С целью отобрать 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 СА 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 селекции.

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 афинности клонов в ИФА, наработка отобранных антител в периплазме бактерий и их иммобилизация на BrCN-сефарозе. В результате фингерпринтного анализа 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, α_2 M. 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. Большая часть мишеней, узнаваемых данными однодоменными антителами, представлена на рисунке 13.

Благодаря проведенным конкурентным селекциям удалось отобрать клоны, кодирующие последовательности наноантител, которые способны распознавать и связывать следующие высокопредставленные белки плазмы крови: альбумин, IgG, IgA, IgM, фибриноген, $\alpha 2M$ (рисунок 14).

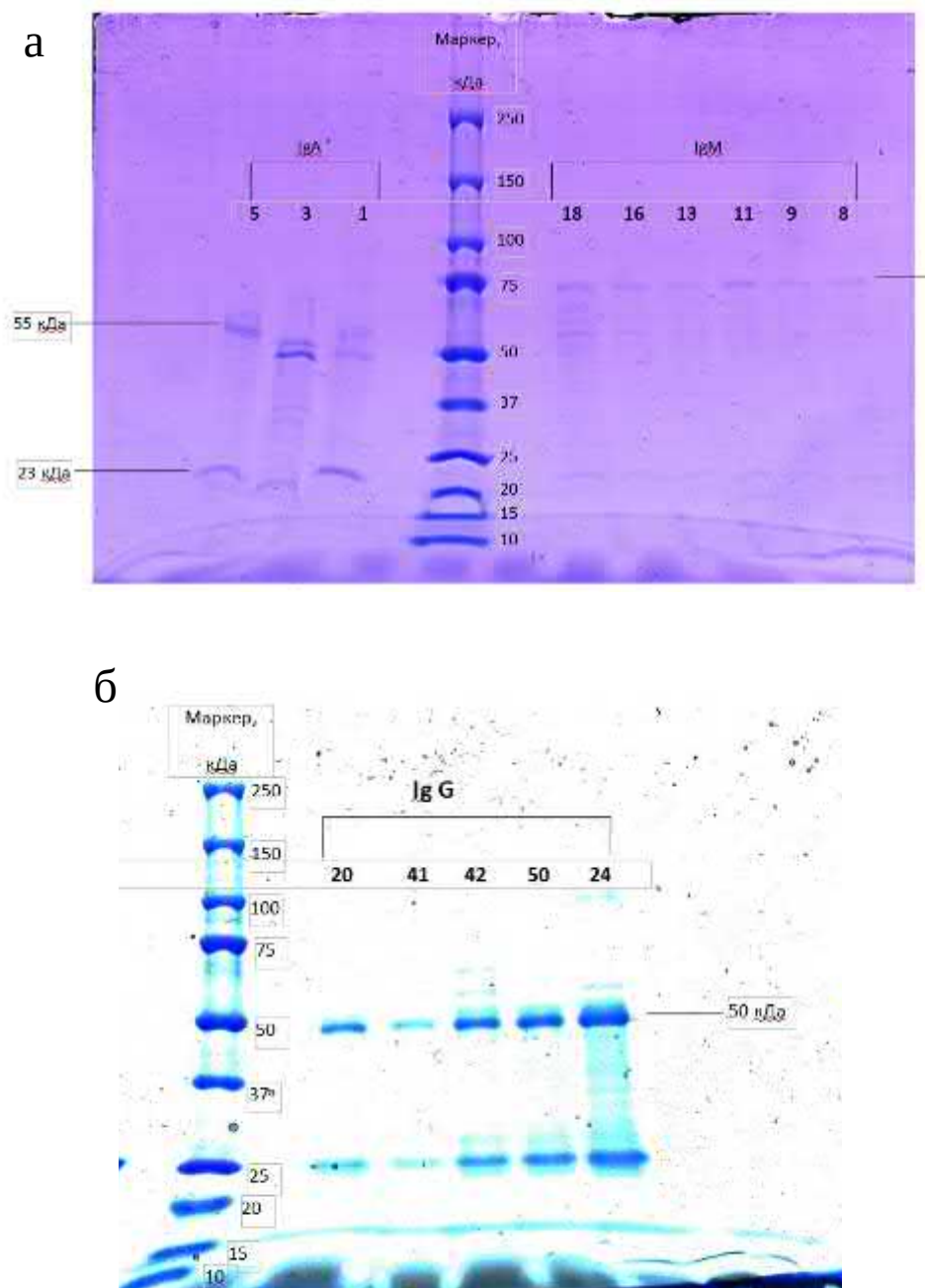


Рисунок 13 – Анализ связывания отобранными в ходе проведённых селекций и иммобилизованными на BrCN сефарозе наноантителами различных классов иммуноглобулинов в 5-19% полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях. Маркер - смесь маркерных белков (Precision Plus Protein Dual Color Standarts, BioRad, США). Подписи обозначают антиген, с которым связывается иммобилизованное однодоменное антитело: **(а)**: IgA – иммуноглобулин A, IgM – иммуноглобулин M; **(б)**: IgG – иммуноглобулин G. В восстанавливающих условиях иммуноглобулины разделяются на два типа цепей, тяжелые и легкие.

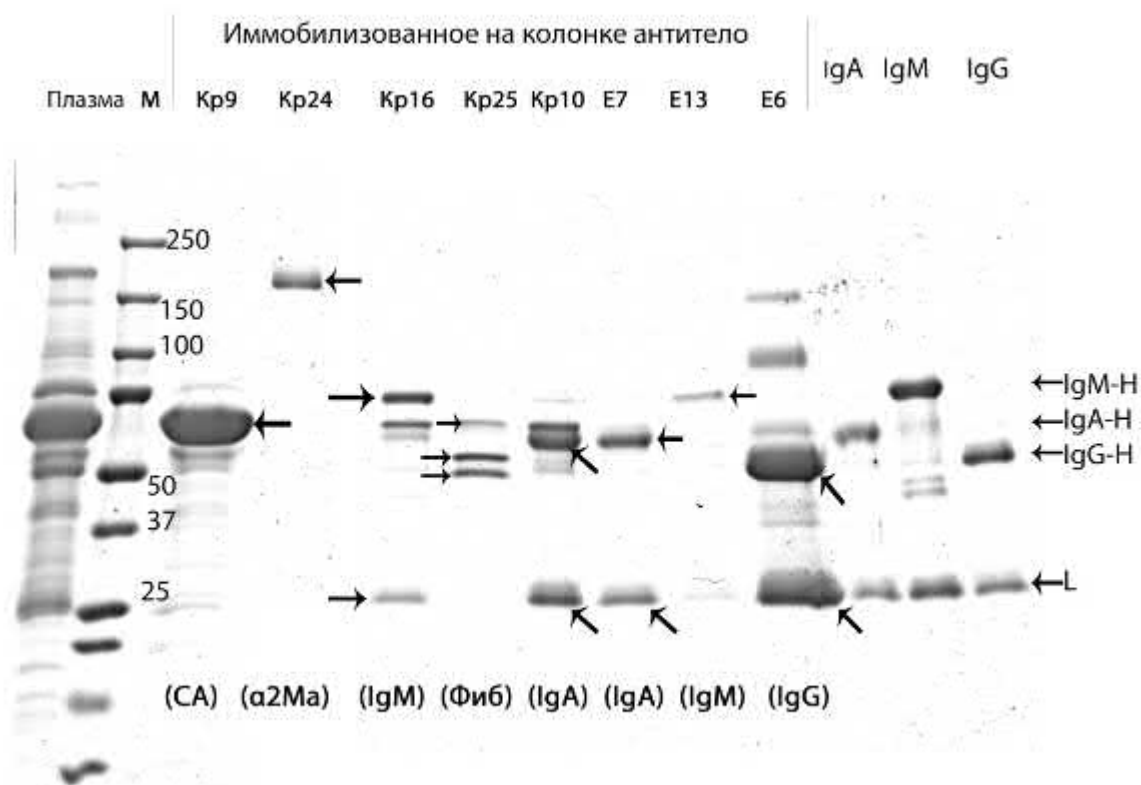


Рисунок 14 – Анализ связывания отобранными в ходе проведённых селекций и иммобилизованными на BrCN сефарозе наноантителами шести различных высокопредставленных белков плазмы крови методом электрофореза в 5-19% полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях. Слева нанесена плазма крови человека и смесь маркерных белков (Precision Plus Protein Dual Color Standarts, BioRad, США). Подписи в скобках обозначают антиген, с которым связывается иммобилизованное однодоменное антитело: СА — сывороточный альбумин, $\alpha 2$ Ma – $\alpha 2$ -макроглобулин, IgM – иммуноглобулин М, Фиб — фибриноген, IgA – иммуноглобулин А, IgG – иммуноглобулин G. Справа в качестве маркеров нанесены коммерческие препараты иммуноглобулинов А, М и G. В восстанавливающих условиях иммуноглобулины разделяются на два типа цепей, тяжелые (H) и легкие (L), при проведении электрофореза в восстанавливающих условиях, в то время как фибриноген размером 340 кДа распадается на полосы трех размеров: 67 кДа, 56 кДа и 47 кДа.

3.2.Использование полученных иммуносорбентов для специфического истощения плазмы или сыворотки крови человека. Вторая иммунизация верблюда истощённой плазмой крови человека

С целью получения обеднённой плазмы крови человека для последующих иммунизаций, проводилось специфическое истощение препарата исходной плазмы крови путём её пропускания через иммуносорбенты с иммобилизованными наноантителами к идентифицированным мажорным белкам, а также коммерческие колонки Affi-Gel Blue-Gel (Bio-Rad, США) и Protein G Sepharose (ИМТЕК, Россия). Для этого свежеприготовленную плазму крови разводили в 10 раз в Na-фосфатном буфере, pH 7.1, и последовательно пропускали через колонки Affi-Gel Blue-Gel, связывающие альбумин, Protein G Sepharose, 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 объемом 2 мл. Для проверки качества истощённой плазмы методом электрофореза в 5–19%-ном акриламидном градиентном геле на каждом этапе отбирали аликвоты проскоков (собственно плазмы с удалёнными заданными белками) и элюатов (рисунок 15). Конечный объем предочищенной плазмы крови составлял 30 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. Клонирование и селекции проводили так же, как было описано ранее.

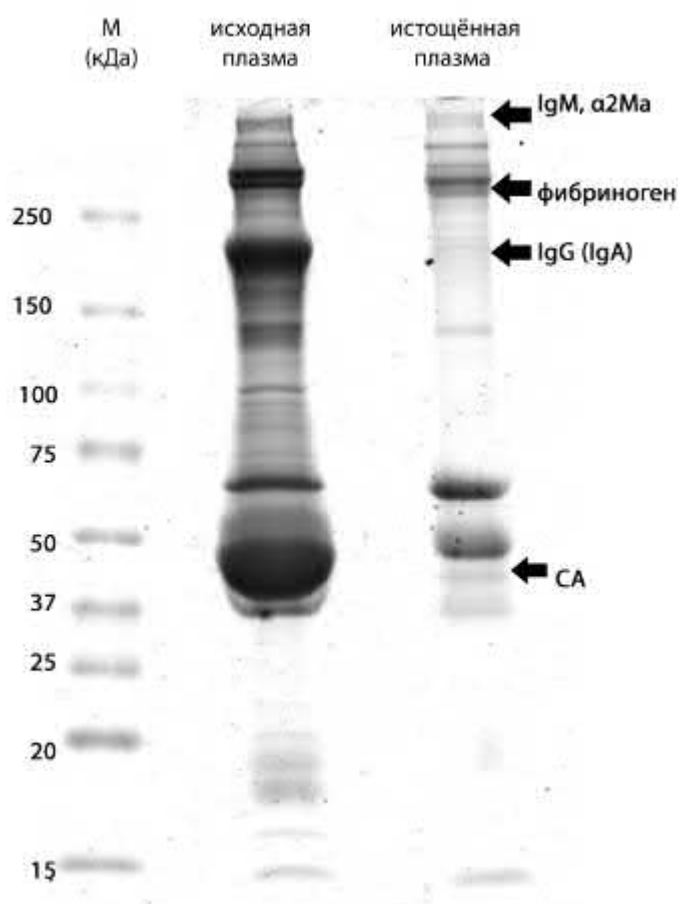


Рисунок 15 – Сравнительный анализ методом электрофореза в 5-19% полиакриламидном геле в невосстанавливающих условиях белкового состава исходной плазмы крови человека и специфически истощенной плазмы крови. М – смесь маркерных белков (Precision Plus Protein Dual Color Standarts, “BioRad”, США) Стрелками указаны местоположения истощённых/удалённых белков.

Полученной истощённой плазмой проводили иммунизацию верблюда. 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), однако идентифицировать белки-мишени плазмы крови, узнаваемые этими группами, пока не удалось. Оставшиеся 5 из 17

отобранных клонов обладали индивидуальным паттерном рестрикции, однако их мишени также предстоит идентифицировать.

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 16).

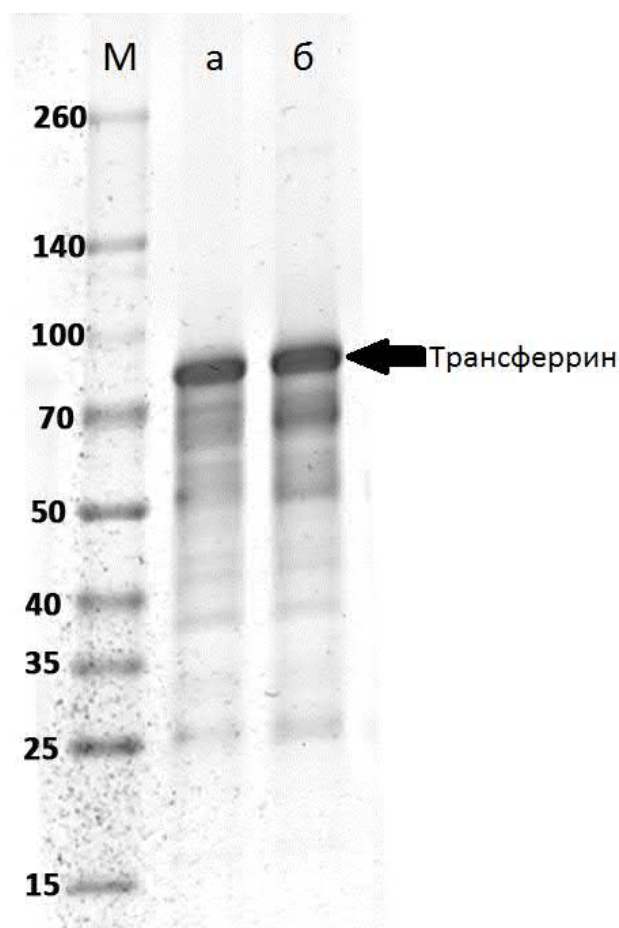


Рисунок 16 – Электрофоретический анализ в 5-19% полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях белков плазмы крови, специфически связавшихся с иммобилизованными на сефарозе однодоменными антителами. Связавшиеся белки в выявленных образцах ((a) и (б)) идентифицированы как трансферрин. М – смесь маркерных белков Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США).

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

3.3.1. Использование полученных иммуносорбентов для специфического удаления некоторых высокопредставленных белков с целью уменьшения неспецифического фонового сигнала и повышения чувствительности при диагностическом иммуноферментном анализе на примере белка-лактоферрина

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, 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 мы проверили эффективность предобработки плазмы крови от мажорных белков для детекции в препаратах таких диагностически важных маркеров, как лактоферрин (ЛФ) и карциноэмбриональный антиген (КЭА) [3, 4].

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 организма как человека, так и патогенных организмов. Данный белок обладает противомикробной, противоопухолевой и противовоспалительной активностью и может выступать в качестве

биомаркера аллергических и онкологических заболеваний [31, 35]. 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 в диагностическом иммуноферментном анализе.

Препараты плазмы здоровых доноров, разведённые в 40 раз (предоставлены Медицинским радиологическим научным центром им. А.Ф. Цыба – филиалом ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России), последовательно пропускали через 6 разных колонок с иммобилизованными на BrCN-сефарозе наноантителами к СА, IgG, IgM, IgA, фибриногену или $\alpha 2M$ соответственно. Полученные препараты анализировались в сэндвич-ИФА на предмет детекции лактоферрина. Также в каждом случае мы проводили дополнительное удаление детектируемого антигена (ЛФ), в результате чего анализировались препараты как до, так и после удаления ЛФ. Иммуноферментный анализ в «сэндвич»-формате проводили, как описано ранее [160] с небольшими модификациями [4]. Иммобилизацию 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% сыворотке верблюда (которая была получена нами перед началом иммунизации животного) в 1% 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 перемешивании. 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) [4].

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 СА, IgA и IgM также не обеспечивает значительного повышения чувствительности ИФА. При этом удаление IgG, фибриногена и α 2М обеспечивает снижение неспецифического фона при детекции ЛФ (рисунок 17).

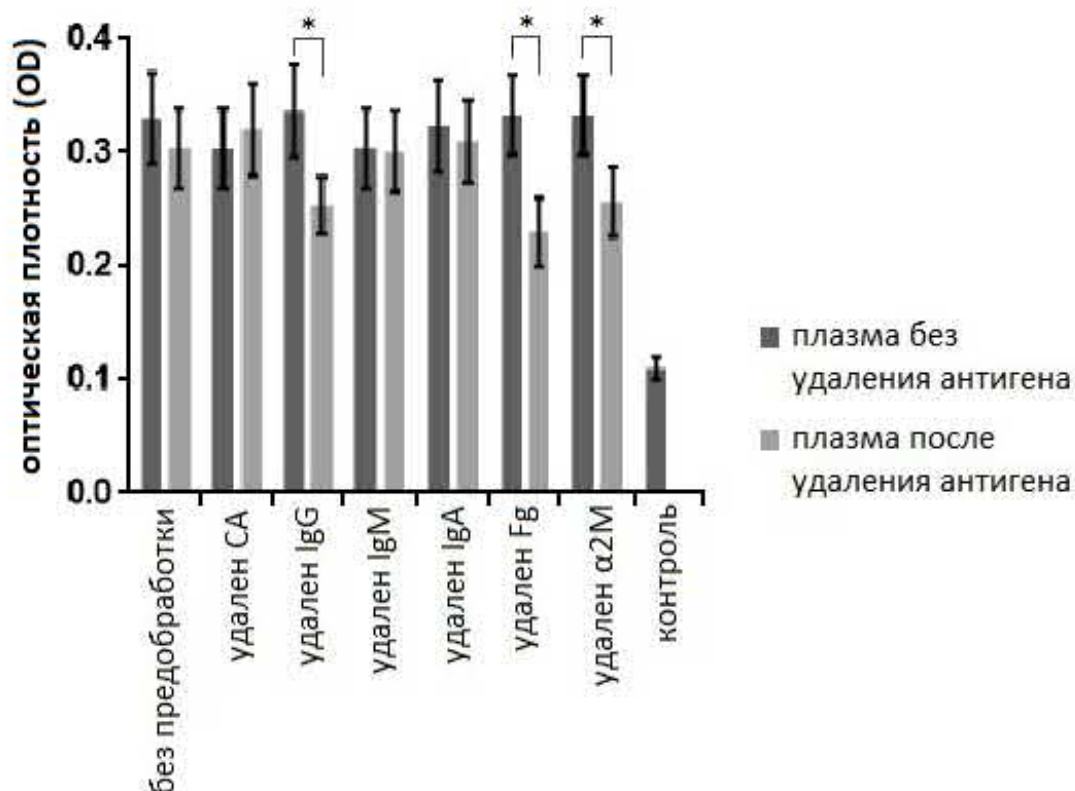


Рисунок 17 – Проверка снижения неспецифического фона (в результате истощения плазмы от заданного высокопредставленного белка) при детекции лактоферрина в разведённой 1:40 плазме крови человека методом иммуноферментного анализа. Анализу подвергались исходные необработанные препараты и шесть препаратов 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. Для этого последовательно пропускались препараты плазмы крови двух пациентов через три иммуносорбента с иммобилизованными наноантителами к IgG, фибриногену и α 2макроглобулину соответственно [4]. 20 мкл периферической плазмы крови двух здоровых доноров, предоставленной Медицинским радиологическим научным центром им. А.Ф. Цыба – филиалом ФГБУ “НМИЦ радиологии” Министерства здравоохранения РФ, разводили в 20 раз в стандартном солевом буфере PBS. Разбавленную плазму в объёме 400 мкл последовательно пропускали через 3 иммуносорбента, полученных в результате пришивки наноантител к CNBr-активированной сефарозе 4В, иммобилизацию проводили аналогично описанному ранее протоколу. Объем каждой из трёх колонок с иммобилизованными в количестве 0,25 мг наноантителами либо к фибриногену, либо к IgG, либо к α -2-макроглобулину составлял примерно 0,15 мл (1,7 мг наноантитела на 1 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 (рисунок 18). Полученные истощённые препараты плазмы, разведённые в 45 раз, использовали для иммуноанализа с целью детекции ЛФ. Здесь также проводилось дополнительное удаление детектируемого антигена, в результате чего анализировались препараты как до, так и после удаления ЛФ.

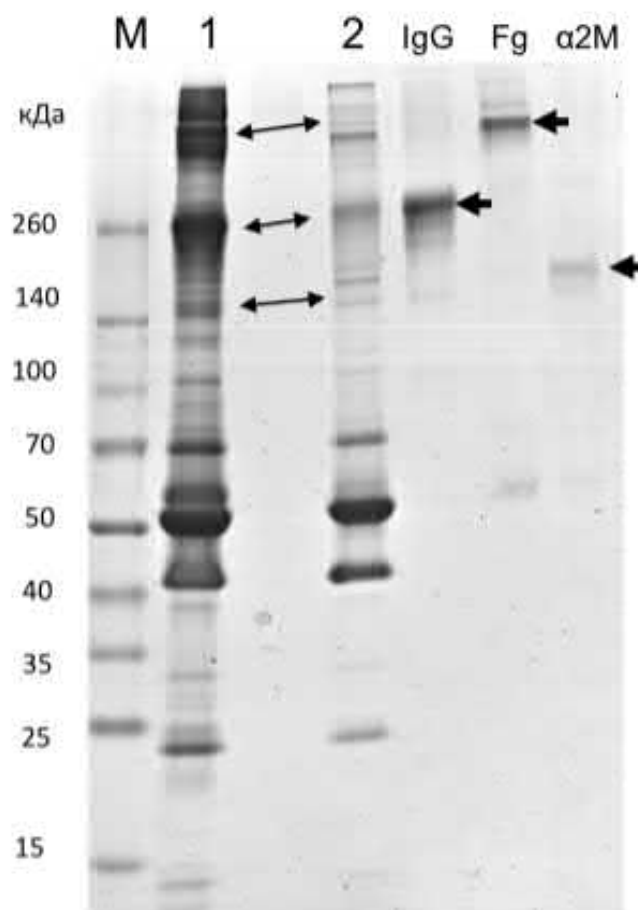


Рисунок 18 – Электрофореграмма препаратов плазмы крови, используемых для дальнейшего иммуноферментного анализа с целью детекции лактоферрина, полученная в 5-19% градиентном полиакриламидном геле в невосстанавливающих условиях. (1) — препарат исходной плазмы крови, (2) — истощённый препарат. IgG, Fg и $\alpha 2M$ — элюаты связавшихся с антителами иммуноглобулина G, фибриногена и альфа2макроглобулина соответственно (положение и размер указаны стрелками). М — смесь маркерных белков (Spectra BR, Thermo Scientific). На электрофорез наносили 0,5 мкл препаратов плазмы крови, и аликвоты элюатов связавшихся белков, эквивалентные 1 мкл плазмы крови.

Одновременное удаление IgG, фибриногена и $\alpha 2M$ 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 19а).

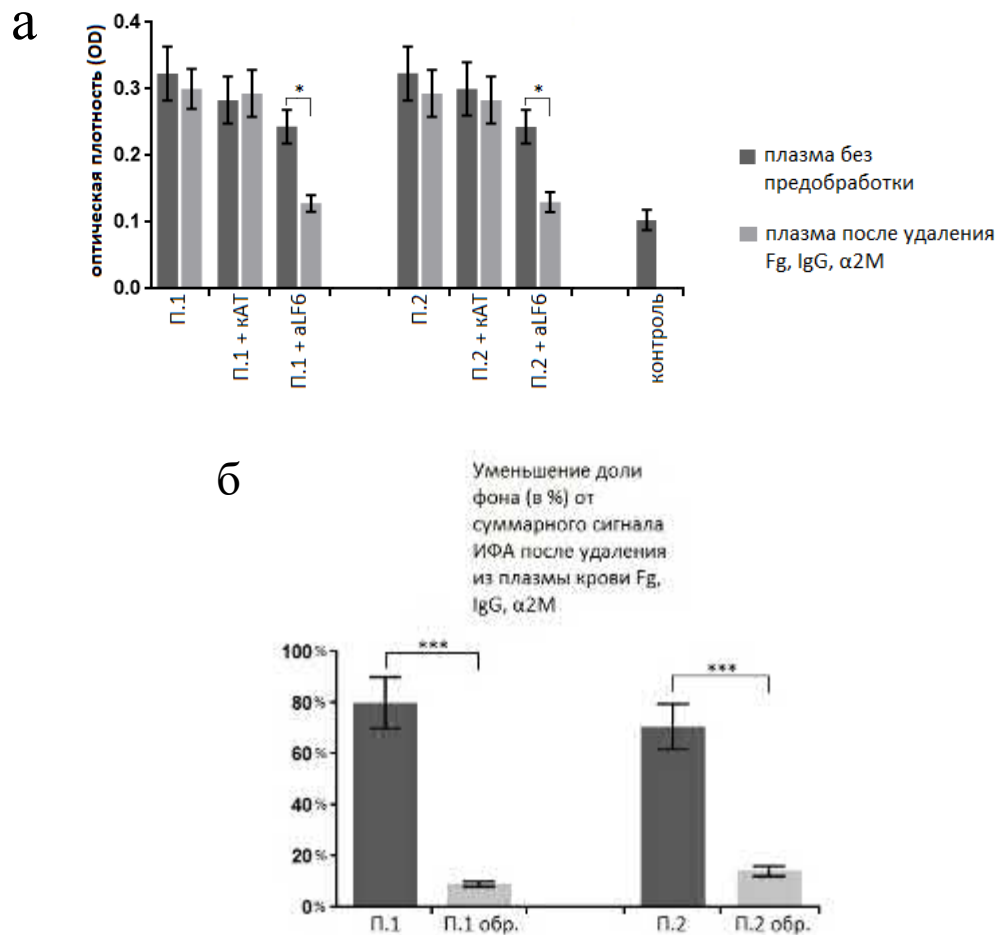


Рисунок 19 – Результаты детекции лактоферрина методом ИФА после суммарного истощения в плазме крови человека иммуноглобулина G (IgG), фибриногена (Fg) и α2макроглобулина (α2M). Использовались разведённые в 40 раз препараты плазмы, полученные от двух здоровых доноров, пациентов (П.1 и П.2). **(а)**: анализ 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+αLF6) 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).

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 19б). 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.

3.3.2. Использование полученных иммуносорбентов для специфического удаления некоторых высокопредставленных белков с целью проверки возможного соудаления низкопредставленных белков в последующем иммуноферментном анализе на примере карциноэмбрионального антигена

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, невысокая аффинность используемых агентов для связывания, нахождение целевых биомаркеров в комплексе с удаляемыми мажорными белками. Особенно важную роль такая проблема играет для низкопредставленных белков, чьё содержание в крови исходно не велико 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 был выбран карциноэмбриональный антиген (КЭА).

Карциноэмбриональный антиген — 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 карциноэмбрионального антигена использовали образец плазмы крови онкологического пациента с диагнозом рак яичников IV стадии по классификации FIGO (Медицинским радиологическим научным центром им. А.Ф. Цыба – филиалом ФГБУ «НМИЦ радиологии»). В качестве антикоагулянта использован гепарин (50 ед./мл).

Исходный препарат плазмы крови онкологического больного пропускать через иммуносорбенты с иммобилизованными однодоменными антителами к СА и иммуноглобулинам различных классов. Далее равные количества полученных очищенных препаратов анализировались путём электрофоретического разделения на предмет специфического удаления заданного белка (рисунок 20а). Затем полученные образцы подвергали иммуноферментному анализу на предмет наличия в них карциноэмбрионального антигена с использованием коммерческого набора реагентов “КЭА-ИФА” (К224; ООО “Хема”). Анализ проводили в соответствии с рекомендациями производителя. В лунки 96-луночного готового к использованию полистиролового планшета с иммобилизованными антителами вносили по 100 мкл конъюгата вторичных антител с пероксидазой хрена. В соответствующие лунки вносили в дубликатах по 50 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки вносили в дубликатах по 50 мкл исследуемых образцов плазмы крови. Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых

образцов производили в течение 5-10 минут. Планшет инкубировали в течение 60 минут при температуре $+37^{\circ}\text{C}$. По окончании инкубации лунки отмывали раствором отмывочным раствором 5 раз. Затем во все лунки в течение 2-3 минут вносили по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина. Планшет инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 10-20 минут. Затем во все лунки вносили по 100 мкл стоп-реактанта и измеряли величину оптической плотности содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм (рисунок 20б).

Результаты проведенного эксперимента показывают, что удаление таких высокопредставленных белков как альбумин и иммуноглобулины различных классов не приводит к соудалению или частичной потере низкопредставленного белка карциноэмбрионального антигена. Это говорит о том, что полученные в ходе выполнения данной работы иммуносорбенты можно использовать для специфической очистки крови от вышеназванных мажорных белков, не теряя при этом целевой анализируемый антиген. В дальнейшем мы планируем проверить данный эффект и для других низкопредставленных белков, имеющих диагностический потенциал.

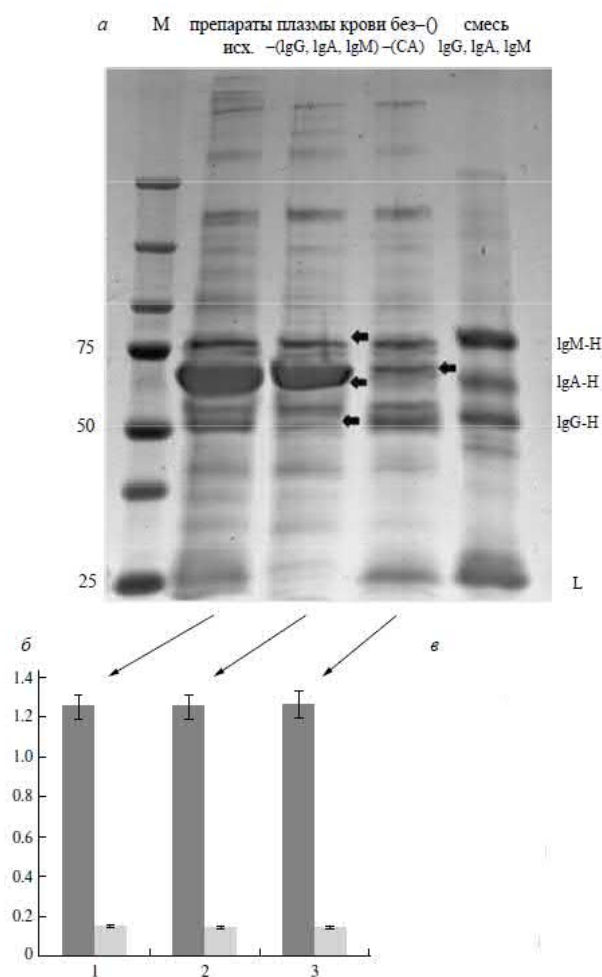


Рисунок 20 – Результаты идентификации методом иммуноферментного анализа количеств карциноэмбрионального антигена (КЭА) в исходной (1) и истощённых от иммуноглобулинов А, G и М (2) и сывороточного альбумина (3) препаратах плазмы крови. Анализ проводили коммерческим набором реагентов “КЭА-ИФА” (К224; ООО “Хема”). 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. Величины темных столбцов (в условных единицах) соответствуют экспериментальным лункам, а более светлые столбцы – контрольные (в них вносились те же препараты плазмы, но после предварительного истощения 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.

4. 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. Интерлейкин-6 (ИЛ-6) - это цитокин со множеством функций. ИЛ-6 регулирует иммунные и воспалительные реакции, синтез белков острой фазы в печени, гематопоз и костный метаболизм. Данный цитокин участвует в патогенезе множества заболеваний: аутоиммунных (в частности, ревматоидного артрита), множественной миеломы и рака простаты. ИЛ-6 обладает как про-, так и противовоспалительными свойствами, и в настоящее время считается важной мишенью для диагностики и последующей терапии. Данный белок представлен в плазме крови в крайне невысоких количествах. Его концентрация в плазме крови меняется в зависимости от географического положения, этиологии заболевания и состояния здоровья конкретного пациента. Однако 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, а при септическом шоке они увеличиваются до миллиграммовых значений [15]. Тем не менее, концентрация интерлейкина-6 крайне невысока, как в норме, так и при

патологии. В связи с чем крайне важным видится создание надёжного инструментария, применение которого позволит удалять белки, вносящие дополнительный крайне нежелательный фоновый сигнал при детекции этого диагностически важного низкопредставленного маркерного белка (особенно для избежания ложноположительных сигналов, возникновение которых видится весьма вероятным при таких низких уровнях данного антигена).

На данный момент в нашей лаборатории получены и охарактеризованы однодоменные антитела, связывающие ИЛ-6 человека [7, 9]. 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. Ламу иммунизировали специально синтезированным рекомбинантным белком ИЛ-6, наработанным в прокариотической системе экспрессии. Препарат антигена разделяли на 6 частей, содержащих по 0,5 мг белка. 5 из них использовали для проведения пятикратной иммунизации ламы путём осуществления последовательных подкожных инъекций. Оставшуюся часть использовали для дальнейших этапов селекций и анализа отобранных наноантител. Все 6 препаратов замораживали и хранили при -70°C. Непосредственно перед осуществлением очередного этапа иммунизации (инъекцией) один из препаратов размораживали и смешивали с адъювантом LQ (Gerbu, Heidelberg, Германия) в равных пропорциях. Клонирование осуществляли так же, как описано ранее. В фагмидный вектор клонировали весь репертуар кДНК-последовательностей антигенузнающих 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 лампы [163]. Селекцию однодоменных антител проводили методом фагового дисплея. В лунках иммунологического высокосорбционного 96-луночного ИФА-планшета из полистирола иммобилизовывали рекомбинантный белок ИЛ-6 (MICROLON 600, Greiner Bio-One, США). В качестве блокирующего буфера использовали 1% обезжиренное молоко (Bio-Rad, США) или 1% БСА (Sigma-Aldrich, США), растворённые в PBS. Селекцию и амплификацию отбираемых фаговых частиц последовательно проводили три раза. Все манипуляции проводили, как описано ранее. По результатам фингерпринтного анализа, проведённого аналогично тому, как описывалось выше, отобранные клоны разделяли на группы [8]. Отобранные клоны анализировались на предмет специфического связывания в иммуноферментном анализе. Для этого в ячейки стандартного 96-луночного полистиролового иммунологического планшета (Microlon 600 hi-binding, Greiner bio-one, США) наносили 2 мкг/мл рекомбинантного белка ИЛ-6, разведённого в 50 мкл PBS. Иммобилизацию антигена проводили при +4°C в течение ночи. Затем лунки отмывали раствором PBS, после чего проводили блокировку 1% раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА), растворённым в PBS, при комнатной температуре. Спустя 2 часа лунки отмывали в PBS и PBS с 0,05% Tween-20 (PBT), после чего наносили растворённые в 50 мкл PBS с содержанием 0,1% БСА анализируемые периплазматические экстракты в количестве 500 нг, и оставляли инкубироваться при комнатной температуре в течение 2 часов при перемешивании. После этого лунки планшета отмывали в PBS и PBT, и наносили в разведении в 2000 раз вторичные антитела цыпленка к НА-тагу, конъюгированные с пероксидазой хрена (CHGT-45P-Z, ICL, Inc., США), растворённые в PBS с добавлением 0.1% БСА. Антитела инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После этого лунки планшета отмывали в PBS и PBT, степень активности фермента пероксидазы хрена

определяли с использованием в качестве хромогенного субстрата ABTS. При длине волны 405нм измеряли оптическую плотность. В качестве контроля использовали лунки без добавления антигена, но прошедшие аналогичные стадии дальнейшего анализа параллельно с лунками с добавленным антигеном. 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 (таблица 3). Экспрессию и очистку антител производили аналогично описанным выше подходам. В итоге было отобрано три высокоспецифичных однодоменных антитела к ИЛ-6 (рисунок 21).

Таблица 3. Аминокислотные последовательности однодоменных антител, специфически связывающих ИЛ-6. Жирным шрифтом выделены и подчеркнуты последовательности, соответствующие гипервариабельным участкам CDR1, CDR2 и CDR3 (от N- к С-концу, слева направо). Знаком (*) обозначена последовательность, содержащая линкерный участок, последовательности НА- и His-тэгов.

Название антитела	Последовательность
VHH 44	Malqevqlvesggglvqpggslrlscaas gniariavmg wyrqapgkqrelva hifsggnti yvdsvkg rftisranaqntvylqmnsllkpedtavyy cnarvvtsgtyn ywgqgtqvtvss
VHH 49	Malqevqlvesggglvqaggsllrlscaas gsirsii rmawyrqapgkrrrelva hiisggstnv adsvkg rftisrdgakntvhlqmnsllkpedtaiyy cnvrdlysttye ywgqgtqvtvss
VHH 87	Malqevqlvesggglvqaggsllrlscaas gtirsii rvawyrqapgkqrelva hiisggstgya dsvkg rftisrdgakntvylqmnsllkpedtaiyy cnvrdlystsy eywgrgtqvtvss

*epkipqpqkpqpqpqpqkpqkpqpesgrypydvpdyasgrgshhhhhh

Исследование кинетики взаимодействия полученных наноантител с ИЛ-6 и анализ на нейтрализующую активность рекомбинантного ИЛ-6 человека проводились в лаборатории молекулярных механизмов иммунитета Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. На основе отобранных однодоменных антител были созданы биспецифические конструкторы с целью их испытания на мышинных и клеточных моделях [5, 7, 9]. В дальнейшем планируется использование полученных однодоменных антител для исследовательских и диагностических целей.

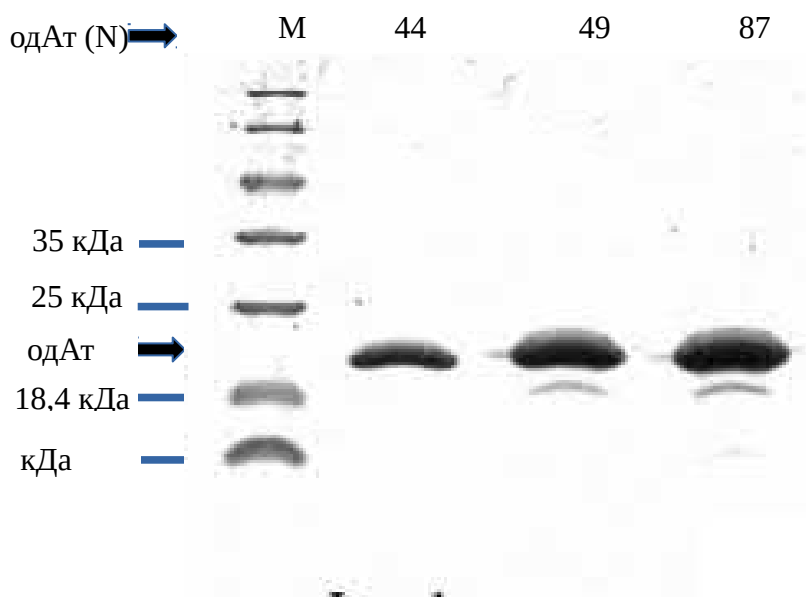


Рисунок 21 – Анализ методом электрофореза в 14%-ном полиакриламидном геле наработанных и очищенных однодоменных антител, специфически узнающих ИЛ-6 человека. М – смесь маркерных белков Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific, США).

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Одним из важных и перспективных направлений исследовательской деятельности является создание высокочувствительных, качественных и надёжных инструментов для решения многочисленных задач, которые ставятся на сегодняшний день перед исследователями и клиницистами. Одним из инструментов, максимально удовлетворяющим данным требованиям, является антитело. В клинической лабораторной диагностике, фармацевтической промышленности и других востребованных прикладных областях чаще всего используются классические моноклональные антитела. С одной стороны, такие антитела действительно являются качественными инструментами, обладающими, как правило, высокой специфичностью и аффинностью. С другой стороны, наличие ряда существенных минусов (крупный размер и комплексное строение, что затрудняет или делает невозможным распознавание такими антителами ряда эпитопов, усложняет генно-инженерные манипуляции и обеспечивает дороговизну наработки) не делает широко распространённые моноклональные антитела универсальным инструментарием. В связи с этим по-прежнему актуален запрос на создание альтернативных эффективных методов и подходов, основанных на использовании антител. На сегодняшний день существуют различные конструкции, созданные на основе фрагментов антител и их комбинаций: отдельно используемые Fab-фрагменты антител, химически связанные, би- и трифункциональные антитела, одноцепочечные вариабельные фрагменты и др. Также одним из перспективных вариантов для решения разнообразных биотехнологических и биомедицинских задач является использование наноантител — производных однодоменных антиген-узнающих вариабельных фрагментов особых антител, состоящих только из димера укороченных тяжёлых цепей (при отсутствии лёгких цепей). Молекулярная масса такого наноантитела составляет всего лишь 14 кДа, что делает его одной из самых миниатюрных функциональных молекул среди прочих

антител. Удлиненный гипервариабельный участок CDR3 способствует формированию необычных выступающих паратопов, благодаря чему однодоменные антитела приобретают способность распознавать эпитопы, недоступные классическим полноразмерным антителам. Упрощение генетической модификации наноантител, лёгкость и экономическая эффективность их наработки и получения в бактериальной или дрожжевой системе экспрессии, простота работы с библиотеками переменных фрагментов делают однодоменные антитела конкурентоспособным и высокоэффективным инструментом для решения разнообразных прикладных задач.

Одним из перспективных и пока ещё недостаточно разработанных направлений исследований является изучение протеома крови, выделение заданных целевых белков и субпротеомов, связанных с этими белками (в частности, истощение крови от молекул, создающих интерференции, и, напротив, обогащение конкретными, важными для диагностики, маркерными белками), а также специфическая предобработка плазмы или сыворотки крови для проведения последующих диагностических анализов (например, ИФА) в условиях клинической лаборатории. Существующие на сегодняшний день коммерчески доступные наборы для предобработки препаратов плазмы крови (в том числе на основе классических поли- или моноклональных антител) не являются на 100% специфичными и зачастую их использование приводит к соудалению ряда других белков, многие из которых представляют диагностическую ценность. Также большинство подобных наборов, как правило, нацелено на удаление целой группы высокопредставленных белков, что затрудняет или делает невозможным очистку препарата от заданного конкретного белка. Детекция разнообразных маркеров методом иммуноферментного анализа, широко используемым в клинической лабораторной диагностике, требует тщательной

пробоподготовки, во время которой возможно максимальное истощение/удаление интерферирующих (вносящих фоновый сигнал) белков из образца пациента с сохранением в последнем целевого анализируемого белка для получения достоверного результата. Проанализировав данную информацию, мы пришли к выводу, что получение и использование однодоменных антител для решения этих проблем является актуальной задачей сегодняшнего дня.

Таким образом, целью данной работы явилось создание, адаптация и исследование новых инструментов на основе однодоменных антител, специфически связывающих целевые белки крови (как высоко-, так и низкопредставленные), для повышения эффективности диагностических анализов биомаркеров в анализируемых образцах плазмы и сыворотки крови человека.

В данной работе нами впервые использовалась процедура последовательного поэтапного генерирования однодоменных антител к различным богато представленным белкам плазмы крови. Данная процедура включала в себя ряд принципиальных этапов. Во-первых, в качестве антигенного материала использовалась плазма крови — сложная протеомная смесь, состоящая из десятков тысяч белков. Далее осуществлялся отбор и клонирование последовательностей, кодирующих особые однодоменные верблужьи антитела. Следующий этап — это использование процедуры фагового дисплея для проведения последовательной конкурентной многостадийной селекции специфических вариантов наноантител. Заключительный этап — это наработка отобранных клонов антител, распознающих белки плазмы крови человека, с целью их использования в дальнейшей работе, а также их функционального анализа. Нарботанные адаптированные антитела иммобилизовывали на агарозном носителе, BrCN-сефарозе, получая таким образом новые иммуносорбенты. С целью

идентификации узнаваемых наноантителами мишеней через полученные колонки пропускали плазму крови человека, затем проводили элюцию связавшихся с антителами белков, их проверку в полиакриламидном геле и последующую идентификацию антигенов посредством масс-спектрометрического анализа. Первые полученные по такой схеме VHH использовали для блокировки и конкурентной селекции при повторных отборах белков из той же, ранее полученной, библиотеки последовательностей наноантител. Полученные в результате проведения двух трёхэтапных селекций наноантитела иммобилизовывали на BrCN сефарозе и использовали в форме иммуносорбентов с целью специфического истощения исходной плазмы крови человека. Такую плазму использовали для следующей иммунизации верблюда с целью отбора нового пула антител, узнающих высокопредставленные белки человека. С целью последовательного отбора однодоменных антител к разнообразным белкам, представленным в плазме крови человека, можно проводить множество циклов вышеописанной процедуры поэтапного генерирования антител. Общая схема такой процедуры представлена на рисунке 22.

В ходе проведения данной работы были получены панели однодоменных антител к ряду высокопредставленных белков крови: сывороточному альбумину, иммуноглобулинам разных классов (IgA, IgG, IgM), фибриногену, альфа-2-макроглобулину. Несмотря на то, что в качестве антигена нами использовалась сложная белковая смесь, данная процедура позволила генерировать панели высокоспецифичных антител, узнающих различные мажорные белки протеома плазмы. Уже из первой полученной библиотеки однодоменных антител нам удалось получить наноантитела, узнающие шесть белков плазмы крови человека. У нас есть вторая иммунная библиотека, содержащая последовательности VHH, которая была получена в результате иммунизации верблюда истощённой плазмой крови. Помимо уже

полученных однодоменных антител к сывороточному альбумину, иммуноглобулинам разных классов, фибриногену и альфа-2-макроглобулину мы надеемся получить из данной библиотеки новые разнообразные однодоменные антитела к другим высокопредставленным белкам плазмы. Однако с уже имеющимся ограниченным инструментарием на основе наноантител нам удалось показать, что удаление некоторых мажорных белков из плазмы крови не только не приводит к потерям целевых исследуемых белков (например, КЭА и лактоферрина), но и заметно снижает неспецифический фон (на примере лактоферрина). Это позволяет предположить, что полученные иммуносорбенты на основе однодоменных антител обладают конкурентными преимуществами по сравнению с ныне существующими коммерчески доступными препаратами. Например, предобработка крови на часто используемом для удаления сывороточного альбумина агенте — красителе Cibacron blue, иммобилизованном на агарозе — приводит к удалению значительного количества нецелевых белков в получаемой обедненной фракции, несмотря на высокое сродство красителя к альбумину и эффективную степень его связывания с данным белком. Также существующие на сегодняшний день коммерчески доступные системы невозможно оптимизировать для индивидуального случая. Например, популярные на сегодняшний день коммерческие системы для предобработки крови (MARS «Top-6» (Agilent (Wilmington, DE)), ProteoPrep-20 (Sigma)) предназначены для удаления целого пула белков без возможности избирательного удаления одного белка, или их заданной комбинации. Однако в результате проведенных в данной работе исследований было показано, что, например, для достоверной детекции лактоферрина в плазме крови достаточным является истощение плазмы лишь от нескольких белков — фибриногена, альфа-2-макроглобулина и иммуноглобулина G. И если удаление прочих мажорных белков не является критичным для последующей детекции лактоферрина в ИФА, то для низкопредставленных белков этот

момент может оказаться ключевым. Уже известно, что удаление альбумина из плазмы крови приводит к неспецифическому соудалению ряда цитокинов из исследуемого образца. Соответственно, неоспоримым преимуществом является возможность комбинаторно использовать наши иммуносорбенты с целью предочистки плазмы или сыворотки крови для последующей ИФА-детекции конкретного биомаркера.

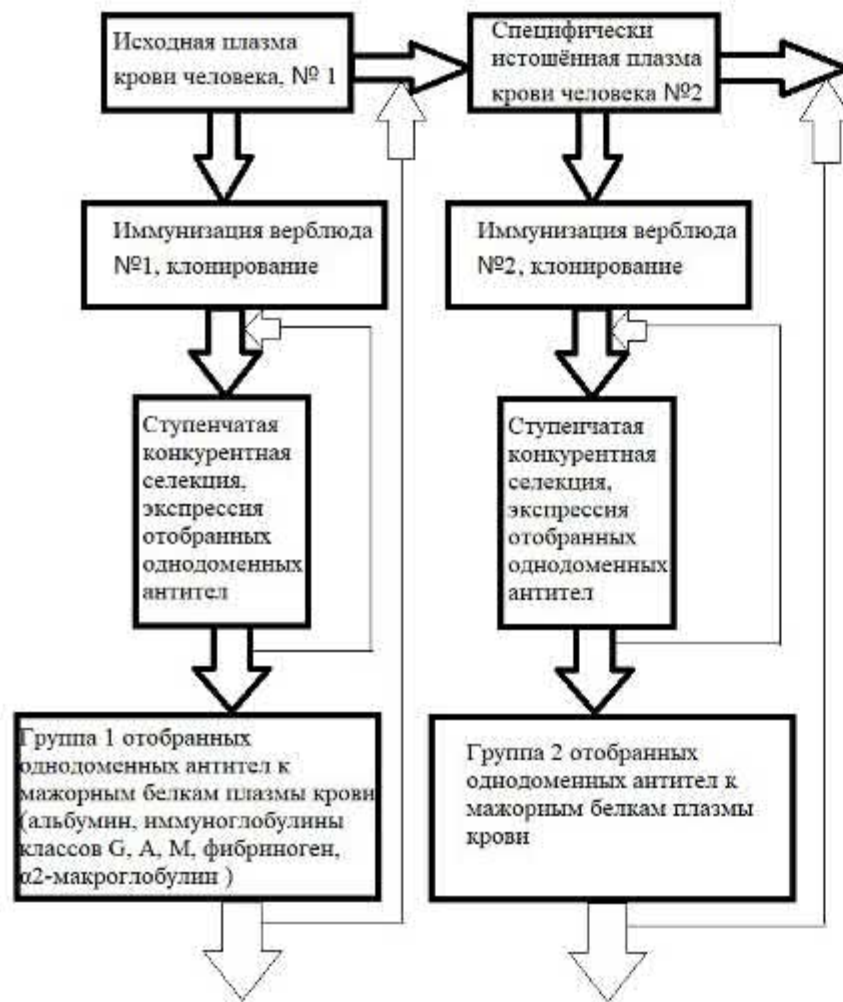


Рисунок 22 – Процедура последовательного поэтапного генерирования наноантител к высокопредставленным белкам плазмы крови человека. Последовательность проводимых этапов обозначена тёмными стрелками. Светлые линии со стрелками обозначают связь стадий получения и использования получаемых наноантител: в качестве белков для блокировки и конкурентной селекции при повторных отборах при повторных отборах белков из ранее полученной библиотеки последовательностей наноантител (стрелка влево) или для направленного истощения узнаваемых ими белков-мишеней в плазме крови (стрелка вверх).

Мы показали, что плазма и сыворотка крови, из которых удалены некоторые мажорные белки, являются более оптимальной базой для постановки иммуноферментного анализа по сравнению с необработанными препаратами. Уровень фонового сигнала и вероятность возможных интерференций в таких пробах значительно снижается, что, в свою очередь, качественно повышает достоверность проводимых диагностических анализов.

С другой стороны, сами по себе высокопредставленные белки являются высокоинформативными молекулами, зачастую ассоциированными с другими белками, субпротеомами. Анализ этих белков или их комплексов, связанных с другими белками, может иметь диагностически важное значение. И альбумин, и иммуноглобулины, и фибриноген, и альфа-2-макроглобулин являются маркерами ряда заболеваний, и изучение их качественного и количественного состава после изоляции этих белков из общего протеома плазмы крови, также видится возможным прикладным применением полученных нами иммуносорбентов.

В дальнейшем предполагается создание универсальной системы предобработки плазмы и сыворотки как для образцов крови, полученных от разных пациентов, так и для разнообразных антигенов. Для осуществления этой цели проводится решение следующих задач: 1) удаление интерферирующих антител, вносящих помехи при проведении диагностических анализов (в частности, иммуноферментного анализа); 2) снижение неспецифического фонового сигнала; 3) диссоциация комплексов, содержащих антиген (для этой цели планируется использование детергентов или изменение уровня pH). Основным объектом научного интереса и исследований в данном направлении для нас являются белки-маркёры, специфические для онкологических заболеваний. Так, помимо уже полученных ранее в нашей лаборатории антител, связывающих

карциноэмбриональный антиген, были отобраны и охарактеризованы наноантитела, связывающие некоторые другие маркерные белки: альфа-фетопротеин (АФП), муцин (MUC1), простатспецифический антиген (ПСА), семафорин (SEMA), метастазин (Mts), СА-125 (муцин-16), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и ряд других. Также для создания универсальной системы предобработки плазмы в лаборатории имеются образцы крови нескольких пациентов с диагнозом рак яичника IV стадии по классификации FIGO, за предоставление которых мы благодарим Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ “НМИЦ радиологии” Министерства здравоохранения РФ.

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 полученный инструментарий, в частности, иммуносорбенты на основе иммобилизованных специфических однодоменных антител, планируется исследовать разные возможности предобработки для разных вариантов маркерных антигенов. Образцы плазмы разных пациентов обладают уникальным протеомным составом и, вероятно, содержат различное количество молекул и белков (в том числе, гетерофильных антител), влияющих на возникновение интерференций и приводящих к развитию ложного сигнала при проведении диагностических анализов. Разработка универсальной, стандартизированной методики предобработки плазмы крови, основанной на использовании высокоспецифических иммуносорбентов, позволит проводить параллельный анализ нескольких антигенов в анализируемом препарате, а также устранить фоновые сигналы, возникающие в исследуемых образцах разных пациентов.

Улучшить систему диагностики также возможно путём повышения чувствительности сигнала, возникающего в результате проведения иммуноферментного анализа. Возможными путями амплификации сигналов являются использование системы АВС, либо системы биотин-стрептавидин, либо технологии иммуно-ПЦР. Система АВС (аббревиатура от английского Avidin-Biotin Complex) основана на формировании комплекса между молекулами авидина и биотина. Реакция взаимодействия между этими белками является наиболее сильной из известных нековалентных взаимодействий между белком и лигандом. Формирование комплекса происходит очень быстро, а воздействие экстремальных значений pH и температур, органических растворителей и денатурирующих агентов не влияет на целостность уже сформировавшегося комплекса. Использование системы АВС крайне эффективно для постановки иммуноферментного анализа. Реакция связывания основана на инкубировании биотинилированных вторичных антител с комплексом «авидин-биотинилированный фермент». Другим возможным вариантом является использование в данной системе белка стрептавидина вместо авидина. Реакция аплификации в этих случаях происходит за счёт двух механизмов. Во-первых, реакция биотинилирования обеспечивает появление множества биотиновых меток на поверхности антитела, что обеспечивает связывание с данным антителом нескольких молекул авидина или стрептавидина. Эффективному формированию комплексов «биотин-авидин/стрептавидин» способствует наличие у белков авидинового типа четырех сайтов связывания с биотином, что обеспечивает более эффективное взаимодействие этих молекул. Во-вторых, взаимодействие стрептавидина с биотинилированным ферментом приводит к образованию конъюгатов с более чем одной молекулой фермента. В итоге происходит формирование иммунных комплексов, содержащих большое число молекул фермента, что

обеспечивает усиление сигнала по сравнению с классическим вариантом ИФА.

Ещё один возможный путь для амплификации детектируемого сигнала в ИФА — это иммуно-ПЦР. Иммуно-ПЦР (immunoPCR, iPCR) — это метод иммунодетекции, сочетающий в себе специфичность ИФА с одновременной ПЦР-амплификацией сигнала. Несмотря на то, что метод ИФА, благодаря использованию специфичных антител, может использоваться для детекции практически любого белка, зачастую его чувствительности недостаточно для обнаружения низкопредставленных антигенов в анализируемом материале. Вместе с тем, хотя использование метода ПЦР (в частности, ПЦР в реальном времени) и обеспечивает экспоненциальное увеличение сигнала, данный метод не предназначен для непосредственного обнаружения антигена. Иммуно-ПЦР же объединяет два этих метода воедино, и использует преимущества каждого из них: высокую специфичность к антигену и последующую амплификацию (усиление) образующегося сигнала. Для постановки реакции иммуно-ПЦР используется антитело, конъюгированное с олигонуклеотидом. Данный конъюгат выступает в качестве «мостика» между иммунодетекцией антигена посредством ИФА и последующей амплификацией ДНК, приводящей к усилению полученного сигнала. Использование иммуно-ПЦР позволяет повысить чувствительность анализа в 10^8 - 10^9 раз по сравнению с традиционным вариантом ИФА [28]. На сегодняшний день методы иммуно-ПЦР достаточно широко применяются в иммунологических исследованиях и клинической диагностике. В нашей лаборатории планируется проведение исследований, направленных на поиск наиболее эффективной системы для амплификации детектируемых сигналов (в том числе с использованием имеющихся у нас однодоменных антител), что наиболее актуально для представляющих диагностический интерес низкопредставленных белков.

Полученные в результате выполнения данной диссертационной работы однодоменные антитела, связывающие мажорные белки плазмы крови, могут использоваться не только для создания иммуносорбентов, но, в перспективе, и для конструирования таргетных препаратов или биспецифических антител. Например, если одним из компонентов искусственного биспецифического антитела будет однодоменное антитело к какому-либо мажорному белку плазмы крови, это может увеличить период циркуляции конъюгата «наноантитело-лекарство» в крови и/или обеспечить эффективную доставку препарата в целевые органы и ткани. Ещё одним вариантом использования биспецифических антител является мультиэпитопное таргетирование молекулы-мишени. Использование биспецифического конструкта, распознающего различные эпитопы одной и той же молекулы, позволяет повысить аффинность связывания такого антитела с целевой мишенью. Учитывая, что однодоменные антитела зачастую способны связывать эпитопы, недоступные классическим антителам, их использование в составе таких биспецифических конструктов видится целесообразным и весьма перспективным. В контексте данных предположений об использовании наноантител не только в качестве диагностических, но и терапевтических инструментов, вполне резонно может возникнуть вопрос: «Существуют ли в принципе на сегодняшний день препараты на основе однодоменных антител?». Чтобы эти предположения об использовании наноантител не только в качестве диагностических, но и терапевтических инструментов не выглядели голословными, отдельно хочется отметить, что бельгийская фармкомпания Ablynx (будучи уже в составе компании Sanofi) получила одобрение на продажу первого препарата на основе однодоменных антител как на Европейском фармацевтическом рынке, так и на Американском. Данный препарат, Каплацизумаб (Caplacizumab, ALX-0681, Cablivi™), является первым препаратом для лечения редкого, но крайне опасного аутоиммунного заболевания, тромботической тромбоцитопенической

пурпуры. Соответственно, использование наноантител в качестве терапевтических агентов, уже является реальностью сегодняшнего дня.

Ещё один важный момент — возможность выделять из плазмы крови определённый подкласс IgG. IgG делится на 4 подкласса, и при различных заболеваниях каждый подкласс по разному участвует в иммунном ответе. Выделение, изучение и анализ конкретных подклассов иммуноглобулинов из плазмы или сыворотки имеет потенциальную ценность для диагностики ряда заболеваний, например, вирусных или инфекционных. Панель полученных в ходе данной работы наноантител к IgG пока не проанализирована на предмет конкретного узнаваемого ими эпитопа в IgG, т.к. пока целью являлось использование их совокупности для возможного полного удаления всех IgG из препарата крови. Однако в будущем планируется идентифицировать наноантитела и получить соответствующие иммуносорбенты, позволяющие выделять определенный подкласс IgG. Коммерчески доступных препаратов по выделению подклассов IgG, насколько нам известно, пока не существует.

Специфическое удаление некоторых мажорных белков может повысить стабильность препаратов плазмы крови и обеспечить их лучшую сохранность в лабораторных условиях. Например, фибриноген отвечает за формирование кровяного сгустка, и его удаление способствует замедлению процесса коагуляции, а также снижению уровня неспецифических сигналов в последующем ИФА ввиду отсутствия фибриногена, обладающего сродством к иммобилизованным антителам. Белок альфа-2-макроглобулин ($\alpha 2M$) способен связываться с протеазами, и его удаление из плазмы крови может обеспечить повышенную стабильность белков в полученном препарате. Особенно актуальным является удаление данного белка из плазмы, которая будет подвергаться замораживанию и последующему оттаиванию. Дело в том, что конформация $\alpha 2M$ способна меняться в следствие этих воздействий,

в связи с чем утрачивается его способность связывать протеазы, которые, благодаря этому, могут в свободной форме находиться в исследуемом препарате и искажать результаты последующих анализов. Предварительное удаление $\alpha 2M$ и, соответственно, связанных с ним протеаз, может повышать срок хранения данных препаратов и снижать уровень фоновых сигналов в последующих диагностических анализах.

Библиотеки однодоменных антител предположительно могут использоваться в качестве экспериментального инструмента для получения информации сразу о нескольких различных компонентах иммунной системы для каждого конкретного пациента. Идентифицируя белки-мишени, являющиеся маркерами патологических процессов и заболеваний, имеет смысл одновременно проводить поиск мишеней для возможной иммуномодулирующей и иммунокоррекционной терапии. Потенциально существует возможность генерирования однодоменных антител, мимикрирующих такие диагностические и терапевтические мишени (получение так называемых антиидиотипических наноантител) с целью создания, например, вакцин, нацеленных на профилактику возникновения патологических процессов, или их остановку на ранней стадии развития. Именно поэтому теоретически библиотеки однодоменных антител, содержащих как «традиционные» их формы, так и антиидиотипические, могут использоваться для оценки различных составляющих иммунной системы для индивидуальных пациентов.

Таким образом, предполагается возможность специфического обогащения однодоменных антител против всей совокупности идиотипов (уникальных антигенных детерминант для индивидуального антитела или для конкретных рецепторов Т- и В-лимфоцитов). Кроме того, очень полезным может быть получение таких библиотек как для групп здоровых людей, так и для пациентов, находящихся на различных стадиях какого-либо

заболевания. С помощью известных технологий сравнительного анализа этих библиотек существует возможность выявления вариантов наноантител, связанных с патологическими явлениями. После этого можно попытаться идентифицировать конкретные биологические мишени. Проведя подобный анализ для целых групп индивидуумов (здоровых и пациентов с различными заболеваниями) можно создавать уже специфические библиотеки наноантител, которые будут содержать маркерные варианты, соответствующие конкретным заболеваниям. Таким образом, наноантитела могут использоваться в качестве нового дополнительного инструмента для системных исследований совокупности различных процессов в иммунной системе.

Итак, в результате проделанной работы получен новый иммунобиотехнологический инструментарий, использование которого может открыть новые пути и возможности в диагностике, и в дальнейшей возможной перспективе, терапии заболеваний.

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, α 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.

ВНЕДРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ В ПРАКТИКУ

Результаты и данные, полученные в ходе выполнения данной диссертационной работы используются в работе лаборатории молекулярных биотехнологий ИБГ РАН, а также при проведении лекций и практикумов для студентов кафедры иммунологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Ряд антител, полученных в ходе выполнения данной работы, запатентован (Патент Российской Федерации № 2603269 [4] и Патент Российской Федерации № 2599423 [5]).

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 СОКРАЩЕНИЙ

α 2М — альфа-2-макроглобулин

АФП — альфа-фетопроtein

БСА — бычий сывороточный альбумин

ВИЧ — вирус иммунодефицита человека

ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография

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

ПСА — простатспецифический антиген

ПЦР — полимеразная цепная реакция

РНК — рибонуклеиновая кислота

СА — сывороточный альбумин

ТТП — тромботическая тромбоцитопеническая пурпура

АВС — комплекс авидин-биотин

ABTS — 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат)

ADAMTS — суперсемейство металлопротеаз

CDR — гипервариабельный участок

CH — константный домен тяжёлой цепи иммуноглобулина

CL — константный домен лёгкой цепи иммуноглобулина

bFGF — основной фактор роста фибробластов

Fab — участок молекулы иммуноглобулина, связывающий антиген

Fc — участок молекулы иммуноглобулина, связывающийся с эффекторными иммунными клетками

FR — каркасный участок V-домена иммуноглобулина

GBP — GFP-связывающий белок

GFP — зелёный флюоресцентный белок

IgG — иммуноглобулин класса G

IgM — иммуноглобулин класса M

IgA — иммуноглобулин класса A

IgE — иммуноглобулин класса E

IgD — иммуноглобулин класса D

ILZ — изолейциновый zipper

HA — гемагглютинин

HCAb — антитело, состоящее из фрагмента одной тяжёлой укороченной цепи

HMR — рестриктазы Hinf, Msp, Rsa

MUC — муцины

Mts — метастазины

NGF — фактор роста нервов

PDGF — тромбоцитарный фактор роста

RFP — красный флюоресцентный белок

RZ — ризавидин

SC — стрептавидин

scFv — одноцепочечный переменный фрагмент

SEMA — семафорины

TNF- α — фактор некроза опухоли

VCAM — васкулярная молекула клеточной адгезии

VEGF — фактор роста эндотелия сосудов

VH — переменный домен тяжёлой цепи иммуноглобулина

VHH — нанокантитело

VL — переменный домен лёгкой цепи иммуноглобулина

VWF — фактор фон Виллебранда

UlvWF — сверхкрупный мультимер фактора фон Виллебранда

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бурмистрова, Д.А. Однодоменные антитела для диагностики и защиты от урогенитальной инфекции, вызванной *Mycoplasma Hominis*: дис. канд. биол. наук: 03.02.03 / Бурмистрова Дарья Андреевна. – Москва, 2016. – 168 с.
2. Вятчанин, А.С. Генерирование мини-антител для исследования компонентов клеточного ядра: дис. канд. биол. наук: 03.00.03 / Вятчанин Антон Сергеевич. – Москва, 2008. – 118 с.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.

7. 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., Друзкая 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.

8. Тиллиб, С.В. «Верблюжьи антитела» – эффективный инструмент для исследований, диагностики и терапии / С.В. Тиллиб // Молекулярная биология. – 2011. – Т. 45, №1. – С. 77–85.

9. 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. Друзкая, С.А. Недоспасов // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9, № 18. – С. 400-409.

10. Тиллиб, С.В. Фингерпринтный анализ селекции «наноантител» методом фагового дисплея с использованием двух вариантов фагов-помощников / С.В. Тиллиб, Т.И. Иванова, Л.А. Васильев // *Acta Naturae*. - 2010. – Т.2, № 3 (6). – С. 100–108.
11. Abbady, A.Q. Chaperonin GroEL a Brucella immunodominant antigen identified using nanobody and MALDI-TOF-MS technologies / A.Q. Abbady, A. Al-Daoude, A. Al-Mariri, M. Zarkawi, S. Muyldermans // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 2012. – V.146, № 3–4. – P. 254–263.
12. Akazawa-Ogawa, Y. The role of intra-domain disulfide bonds in heat-induced irreversible denaturation of camelid single domain VHH antibodies / Y. Akazawa-Ogawa, K. Uegaki, Y. Hagihara // *J. Biochem.* – 2016. – V. 159, №1. – P. 111–121.
13. Alonzi, T. Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis / T. Alonzi, E. Fattori, D. Lazzaro, P. Costa, L. Probert, G. Kollias, F. De Benedetti, V. Poli, G. Ciliberto // *J. Exp. Med.* – 1998. – V.187, №4. – P. 461–468.
14. Arbabi Ghahroudi, M. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies / M. Arbabi Ghahroudi, A. Desmyter, L. Wyns, R. Hamers, S. Muyldermans // *FEBS Lett.* – 1997. – V. 414, №3 – P. 521–526.
15. Bachelot, T. Prognostic value of serum levels of interleukin 6 and of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor in hormone-refractory metastatic breast cancer patients / T. Bachelot, I. Ray-Coquard, C. Menetrier-Caux, M. Rastkha, A. Duc, J.Y. Blay // *Br. J. Cancer.* – 2003. – V 88, №11. – P. 1721–1726.

16. Barbas, C.F. Phage display: a laboratory manual / C.F. Barbas – NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. – 736 pp.
17. Berry, M.J. Use of antibody fragments in immunoaffinity chromatography. Comparison of FV fragments, VH fragments and paralog peptides / M.J. Berry, J.Davies // J. Chromatogr. – 1992. – V. 597, №1-2. – P. 239-245.
18. Bethin, K.E. Interleukin-6 is an essential, corticotropin-releasing hormone-independent stimulator of the adrenal axis during immune system activation / K.E. Bethin, S.K. Vogt, L.J. Muglia // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – V. 97, № 16. – P. 9317–9322
19. Bever, C.R.S. Development and utilization of camelid VHH antibodies from alpaca for 2,2',4,4'-tetrabrominated diphenyl ether detection / C.R.S Bever, Z. Majkova, R. Radhakrishnan, I. Suni, M. McCoy, Y. Wang, J. Dechant, S. Gee, B. D. Hammock // Anal Chem. – 2014. – V. 86, №15. – P. 7875–7882.
20. Bjerner, J. Immunometric assay interference: incidence and prevention / J. Bjerner, K. Nustad, L. F.. Norum, K.H. Olsen, O. P. Børner // Clinical Chemistry. – 2002. – V. 48, №4 – P. – 613–621.
21. Bolstad, N. A man with abdominal pain: enough evidence for surgery? / N. Bolstad, A.M. Kazaryan, M.-E. Revheim, S. Distant, K. Johnsrud, D.J. Warren, K. Nustad, B. Edwin // Clinical Chemistry. – 2012. – V. 58, №8. – P. 1187–1190.
22. Bolstad, N. Heterophilic antibody interference in commercial immunoassays; a screening study using paired native and pre-blocked sera / N. Bolstad, D.J. Warren, J. Bjerner, G. Kravdal, L. Schwettmann, K.H. Olsen, P.

Rustad, K. Nustad // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. – 2011. – V. 49, №12. – P. 2001–2006.

23. Bolstad, N. Heterophilic antibody interference in immunometric assays / N. Bolstad, D.J. Warren, K. Nustad // *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2013. – V. 27, №5. – P. 647–661

24. Boscato, L.M. Incidence and specificity of interference in two-site immunoassays / L.M. Boscato, M.C. Stuart // *Clinical Chemistry*. – 1986. – V. 32, №8. – P. 1491–1495.

25. Broisat, A. Nanobodies targeting mouse/human VCAM1 for the nuclear imaging of atherosclerotic lesions / A. Broisat, S. Hernot, J. Toczek, J. De Vos, L.M. Riou, S. Martin, M. Ahmadi, N. Thielens, U. Wernery, V. Caveliers, S. Muyldermans, T. Lahoutte, D. Fagret, C. Ghezzi, . Devoogdt // *Circ. Res.* – 2012. – V. 110, №7. – P. 927–937.

26. Campbell, I.L.. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral over-expression of interleukin 6 / I.L. Campbell, C.R. Abraham, E. Masliah, P. Kemper, J.D. Inglis, M.B.A. Oldstone, L. Mucke // *Proc. Natl. Acad. Sci. US*. – 1993. – V. 90. – P. 10061–10065.

27. Chan, B. Site-specific N-terminal auto-degradation of human serum albumin / B. Chan, N. Dodsworth, J. Woodrow, A. Tucker, R. Harris // *Eur. J. Biochem.* – 1995. – V. 227, №1-2. – P. 524–528.

28. Chang, L. Immuno-PCR: An ultrasensitive immunoassay for biomolecular detection / L. Chang, J. Li, L. Wang // *Anal. Chim. Acta.* – 2016. – V. 910, №14. – P. 12–24.

29. Chang, Y. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma / Y. Chang, E. Cesarman, M.S. Pessin, F. Lee, J.

Culpepper, D.M. Knowles, P.S Moore // *Science*. – 1994. – V.266, №5192. – P. 1865–1869.

30. Chatterjee, M. Viral IL-6-induced cell proliferation and immune evasion of interferon activity / M. Chatterjee, J. Osborne, G. Bestetti, Y. Chang, P.S. Moore // *Science*. – 2002. – V. 298, №5597. – P. 1432–1435.

31. Choi, G.S. Serum lactoferrin level as a serologic biomarker for allergic rhinitis / G.S. Choi, S.Y Shin., J.H Kim, H.Y. Lee, N.S. Palikhe, Y. M. Ye, S. H. Kim, H.S. Park // *Clin. Exp. Allergy*. – 2010. – V. 40, №3. – P. 403–410.

32. Collaboration, I.R.G.C.E.R.F. Interleukin-6 receptor pathways in coronary heart disease: a collaborative meta-analysis of 82 studies / IL6R Genetics Consortium Emerging Risk Factors Collaboration // *Lancet*. – 2012. – V. 379, №9822. – P. 1205–1213.

33. Conrath, K.E. Beta-lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in Camelidae. / K.E. Conrath, M. Lauwereys, M. Galleni, A. Matagne, J.M. Frere, J. Kinne, L. Wyns, S. Muyldermans // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2001. – V. 45, №10. – P. 2807–2812.

34. Conrath, K.E. Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae / K.E. Conrath, U. Wernery, S. Muyldermans, V.K. Nguyen // *Developmental & Comparative Immunology*. – 2003. – V. 27, №2. – P. 87-103

35. Damiens. E. Effects of human lactoferrin on NK cell cytotoxicity against haematopoietic and epithelial tumour cells / E. Damiens, J. Mazurier, I. el Yazidi. M. Masson, I. Duthille, G. Spik, Y. Boilly-Marer // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1998. – V. 1402, №3. – P. 277–287.

36. De Genst, E. Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies / E. De Genst, K. Silence, K. Decanniere, R. Loris, J. Kinne, S. Muyldermans // PNAS USA. – 2006. – V. 103, №12. – P. 4586–4891.
37. De Groeve, K., Nanobodies as tools for *in vivo* imaging of specific immune cell types / K. De Groeve, N. Deschacht, C. De Koninck, V. Caveliers, T. Lahoutte, N. Devoogdt, S. Muyldermans, P. De Baetselier, G. Raes // J. Nucl. Med. – 2010. – V. 51, №5. – P. 782–789.
38. De Meyer, T. Nanobody-based products as research and diagnostic tools / T. De Meyer, S. Muyldermans, A. Depicker // Trends Biotechnol. – 2014. – V. 32, № 5. – P. 263–270.
39. Deckers, N. Nanobodies, a promising tool for species-specific diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis / N. Deckers, D. Saerens, K. Kanobana, K. Conrath, B. Victor, U. Wernery, J. Vercruysse, S. Muyldermans, P. Dorny // Int. J. Parasitol. – 2009. – V. 39, №5. – P. 625–633.
40. Deloukas, P. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease / P. Deloukas, The CARDIoGRAMplusC4D Consortium // Nat. Genet. – 2013. – V. 45. – P. 25–33.
41. Despres, N. Grant A.M. Antibody interference in thyroid assays: a potential for clinical misinformation / N. Despres, A.M. Grant // Clinical Chemistry. – 1998. – V. 44, №3 – P. 440–454.
42. DiCosmo, B.F. Airway epithelial cell expression of interleukin-6 in transgenic mice. Uncoupling of airway inflammation and bronchial hyperreactivity / B.F. DiCosmo, G.P. Geba, D. Picarella, J.A. Elias, J.A. Rankin, B.R. Stripp, J.A. Whitsett, R.A. Flavell // J. Clin. Invest. – 1994. – V. 94, №5. – P. 2028–2035.

43. Dienz, O. Essential role of IL-6 in protection against H1N1 influenza virus by promoting neutrophil survival in the lung / O. Dienz, J.G. Rud, S.M. Eaton, P.A. Lanthier, E. Burg, A. Drew, J. Bunn, B.T. Suratt, L. Haynes, M. Rincon // *Mucosal Immunol.* – 2012. – V. 5, №3. – P. 258–66.
44. Dooley, H. Selection and characterization of naturally occurring single-domain (IgNAR) antibody fragments from immunized sharks by phage display / H. Dooley, M.F. Flajnik, A.J. Porter // *Mol. Immunol.* – 2003. – V. 40, №1. – P. 25–33.
45. Dumoulin, M. Single-domain antibody fragments with high conformational stability / M. Dumoulin, K. Conrath, A. Van Meirhaeghe, F. Meersman, K. Heremans, L.G. Frenken, S. Muyldermans, L. Wyns, A. Matagne // *Protein Sci.* – 2002. – V. 11, №3 – P. 500–515.
46. Echan, L.A. Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma / L.A. Echan, H.Y. Tang, N. Ali-Khan, K. Lee, D.W. Speicher. // *Proteomics.* – 2005. – V. 5. – P. 3292–3303.
47. Efimov, G.A. Cell-type-restricted anti-cytokine therapy: TNF inhibition from one pathogenic source / G.A. Efimov, A.A. Kruglov, Z.V. Khlopchatnikova, F.N. Rozov, V.V. Mokhonov, S. Rose-John, J. Scheller, S. Gordon, M. Stacey, M.S. Drutskaya, S.V. Tillib, S.A. Nedospasov // *PNAS.* – 2016. – V. 113, № 11. – P. 3006– 3011.
48. Eugster, H.P. IL-6-deficient mice resist myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis / H.P. Eugster, K. Frei, M. Kopf, H. Lassmann, A. Fontana // *Eur. J. Immunol.* – 1998. – V. 28. – P. 2178–2187.

49. Even-Desrumeaux, K. Strong and oriented immobilization of single domain antibodies from crude bacterial lysates for high-throughput compatible cost-effective antibody array generation / K. Even-Desrumeaux, D. Baty, P. Chames // *Mol Biosyst.* – 2010. – V. 6., №11 – P. 2241–2248.

50. Fanali, G. Human serum albumin: from bench to bedside / A. di Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi // *Mol Aspects Med.* – 2012. – V. 33, №3. – P. 209 – 290.

51. Fibrinogen Studies Collaboration. Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis / Fibrinogen Studies Collaboration // *JAMA.* – 2005. – V. 294. – P. 1799–1809.

52. Fielding, C.A. Viral IL-6 blocks neutrophil infiltration during acute inflammation / C.A. Fielding, M.R. McLoughlin, C.S. Colmont, M. Kovaleva, D.A. Harris, S. Rose-John, N. Topley, S.A. Jones // *J. Immunol.* – 2005. – V. 175, №6. – P. 4024–4029.

53. Fishman, D. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis / D. Fishman, G. Faulds, R. Jeffery, V. Mohamed-Ali, J.S. Yudkin, S. Humphries, P. Woo // *J. Clin. Invest.* – 1998. – V. 102, №7. – P. 1369-1376.

54. Fountoulakis, M. Depletion of the high-abundance plasma proteins / M. Fountoulakis, J.F. Juranville, L. Jiang, D. Avila, D. Röder, P. Jakob, P. Berndt, S. Evers, H. Langen // *Amino Acids.* – 2004. – V. 27, №3-4. – P. 249-259.

55. Fraunberger, P. Prognostic value of interleukin 6, procalcitonin, and C-reactive protein levels in intensive care unit patients during first increase of

fever / P. Fraunberger, Y. Wang, E. Holler, K.G. Parhofer, D. Nagel, A.K. Walli, D. Seidel // *Shock*. – 2006. – V. 26, №1. – P. 10–12.

56. Freeman, A.F. Clinical manifestations of hyper IgE syndromes / A.F., Freeman, S.M. Holland // *Dis. Markers*. – 2010. – V. 29, №3-4. – P. 123–130.

57. Frenken, L.G., Isolation of antigen specific llama VHH antibody fragments and their high level secretion by *Saccharomyces cerevisiae* / L.G. Frenken,, R.H. van der Linden, P.W. Hermans, J.W. Bos, R.C. Ruuls, B. de Geus, C.T. Verrips // *J. Biotechnol.* – 2000. – V. 78, №1. – P. 11–21.

58. Garbers, C. Inhibition of classic signaling is a novel function of soluble glycoprotein 130 (sgp130), which is controlled by the ratio of interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor / C. Garbers, W. Thaiss, G.W. Jones, G.H. Waetzig, I. Lorenzen, F. Guilhot, R. Lissilaa, W.G. Ferlin, J. Grötzinger, S.A. Jones, S. Rose-John, J. Scheller // *J. Biol. Chem.* – 2011. – V. 286, №50. – P. 42959–42970.

59. Gealy, C. Posttranscriptional suppression of interleukin-6 production by human cytomegalovirus / C. Gealy, M. Denson, C. Humphreys, B. McSharry, G. Wilkinson, R. Caswell // *J. Virol.* – 2005. – V. 79, №1. – P. 472–485.

60. Govaert, J. Dual beneficial effect of interloop disulfide bond for single domain antibody fragments / J. Govaert, M. Pellis, N. Deschacht, C. Vincke, K. Conrath, S. Muyldermans, D. Saerens // *J. Biol. Chem.* – 2012. – V. 287, №3. – P. 1970–1979.

61. Granger, J. Albumin depletion of human plasma also removes low abundance proteins including the cytokines / J. Granger, J. Siddiqui, S. Copelan, D. Remic // *Proteomics*. – 2005. – V.5, №18. – P. 4713-4718.

62. Gueorguieva, D. Identification of single_domain, Bax-specific intrabodies that confer resistance to mammalian cells against oxidative-stress–

induced apoptosis / D. Gueorguieva, S. Li, N. Walsh, A. Mukerji, J. Tanha, S. Pandey // *FASEB J.* – 2006. – V. 20, №14. – P. 2636–2638.

63. Gupta, D. Pretreatment serum albumin as a predictor of cancer survival: a systematic review of the epidemiological literature / D. Gupta, C.G. Lis // *Nutr. J.* – 2010. – V. 9, №69. – P. 69–85.

64. Habib, I., VHH (nanobody) directed against human glycophorin A: a tool for autologous red cell agglutination assays / I. Habib, D. Smolarek, C. Hattab, M. Grodecka, G. Hassanzadeh-Ghassabeh, S. Muyldermans, S. Sagan, C. Gutiérrez, S. Laperche, C. Le-Van-Kim, Y. C. Aronovicz, K. Wasniowska, S. Gangnard, O. Bertrand // *Anal Biochem.* – 2013. – V. 438, №1. – P. 82–89.

65. Hamers-Casterman, C. Naturally occurring antibodies devoid of light chains / C. Hamers-Casterman, T. Atarhouch, S. Muyldermans, G. Robinson, C. Hammers, E. Bajyana Songa, N. Bendahman, R. Hammers // *Nature.* – 1993. – V. 363. – P. 446–448.

66. Hammers, C. Antibody Phage Display: Technique and Applications / C. Hammers, J. Stanley // *Journal of Investigative Dermatology.* – 2014. – V. 134, №2. – P. 59–64.

67. Harmsen, M.M. Selection and optimization of proteolytically stable llama single-domain antibody fragments for oral immunotherapy / M.M. Harmsen, C.B. van Solt, A.M. van Zijderveld-van Bommel, T.A. Niewold, F.G. van Zijderveld // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2006. – V. 72, №3. – P. 544–551.

68. He, T. Nanobody-based enzyme immunoassay for aflatoxin in agro-products with high tolerance to cosolvent methanol / T. He, Y. Wang, P. Li, Q. Zhang, J. Lei, Z. Zhang, X. Ding, H. Zhou, W. Zhang // *Anal Chem.* – 2014. – V. 86, №17. – P. 8873–8880.

69. Helma, J. Direct and dynamic detection of HIV-1 in living cells / J. Helma, K. Schmidhals, V. Lux, S. Nüske, A.M. Scholz, H.-G. Kräusslich, U. Rothbauer, H. Leonhardt // PLoS One. – 2012. – V. 7, №11. – P. e50026.

70. Herce, H.D. Visualization and targeted disruption of protein interactions in living cells / H.D. Herce, W. Deng, J. Helma, H. Leonhardt, M.C. Cardoso // Nat Commun. – 2013. – V 4. – P. 2660.

71. Hmila, I. VHH, bivalent domains and chimeric heavy-chain-only antibodies with high neutralizing efficacy for scorpion toxin / I. Hmila, B. A.-B. Abdallah R, D. Saerens, Z. Benlasfar, K. Conrath, M. El Ayeb, S. Muyldermans, B. Bouhaouala-Zahar // Mol. Immunol. – 2008. – V. 45, №14. – P. 3847–3856.

72. Hodes, G.E. Individual differences in the peripheral immune system promote resilience versus susceptibility to social stress / G. E. Hodes, M. L. Pfau, M. Leboeuf, S.A. Golden, D.J. Christoffel, D. Bregman, N. Rebusi, M. Heshmati, H. Aleyasin, B.L. Warren, B. Lebonaté, S. Horn, K.A. Lapidus, V. Stelzhammer, E.H.F Wong, S. Bahn, V. Krishnan, C.A. Bolaños-Guzman, J.W. Murrough, M.Merad, S.J. Russo // PNAS. – 2014. – V. 111, №45. – P. 16136–16141.

73. Hoge, J. IL-6 controls the innate immune response against *Listeria monocytogenes* via classical IL-6 signaling / J. Hoge, I. Yan, N. Jänner, V. Schumacher, A. Chalaris, O.M. Steinmetz, D.R. Engel, J. Scheller, S. Rose-John, H.-W. Mittrücker // J. Immunol. – 2013. – V. 190, №2. – P. 703–711 .

74. Huang, L. SPECT imaging with Tc-99m-labeled EGFR-specific nanobody for *in vivo* monitoring of EGFR expression / L. Huang, L.O.T. Gainkam, V. Caveliers, C. Vanhove, M. Keyaerts, P. De Baetselier, A. Bossuyt, H. Revets, T. Lahoutte // Mol. Imaging Biol. – 2008. – V. 10, №3. – P. 167–175.

75. Huang, L. Prostate-specific antigen immunosensing based on mixed self-assembled monolayers, camel antibodies and colloidal gold enhanced sandwich assays / L. Huang, G. Reekman, D. Saerens, J.M. Friedt, F. Frederix, L. Francis, S. Muyldermans, A. Campitelly, C. van Hoof // *Biosens. Bioelectron.* – 2005. – V. 21, №3. – P. 483–490.

76. Huang, R.S. Inability to measure M-protein with capillary zone electrophoresis (CAPPILLARYS2) in tracings with nondiscernable peaks / R.S. Huang, A. Dasgupta, A.N. Nguyen, A. Wahed // *J. Clin. Lab. Anal.* – 2015. – V. 29, №5. – P. 343–346.

77. Huang, Y. Protein studies in dysferlinopathy patients using llama_derived antibody fragments selected by phagedisplay / Y. Huang, P. Verheesen, A. Roussis, W. Frankhuizen, I. Ginjaar, F. Haldane, S. Laval, L.V.B. Anderson, T. Verrips, R.R. Frants, H. de Haard, K. Bushby, J. den Dunnen, S.M. van der Maarel // *Eur. J. Hum. – Genet.* – 2005. – V. 13. – P. 721–730.

78. Hunter, C. A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease / C. A. Hunter, S. A. Jones // *Nat. Immunol.* – 2015. – V. 16, №5. – P. 448–457

79. Hussack, G. Engineered single-domain antibodies with high protease resistance and thermal stability / G. Hussack, T. Hirama, W. Ding, R. Mackenzi, J. Tanha // *Plos One.* – 2011. – V. 6. – P. e 28218.

80. Travis, J. Isolation of albumin from whole human plasma and fractionation of albumin-depleted plasma / J. Travis, J. Bowen, D. Tewksbury, D. Johnson, R. Pannell // *Biochem J.* – 1976. – V. 157, №2. – P. 301–306.

81. Jobling, S.A. Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody fragments / S.A. Jobling, C. Jarman, M.M. Teh, N. Holmberg, C. Blake, M.E. Verhoeyen // *Nature Biotechnol.* – 2003. – V. 21, №1. – P. 77–80.

82. Jones, K.D. Involvement of interleukin-10 (IL-10) and viral IL-6 in the spontaneous growth of Kaposi's sarcoma herpesvirus-associated infected primary effusion lymphoma cells / K.D. Jones, Y. Aoki, Y. Chang, P.S. Moore, R. Yarchoan, G. Tosato // *Blood*. – 1999. – V. 94, №8. – P. 2871–2879.

83. Jones, S.A. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling / S.A. Jones, J. Scheller, S. Rose-John // *J. Clin. Invest.* – 2011. – V. 121, №9. – P. 3375–3383.

84. Kijanka, M. Rapid optical imaging of human breast tumour xenografts using anti-HER2 VHHs site-directly conjugated to IRDye 800CW for image-guided surgery / M. Kijanka, F.-J. Warnders, M. El Khattabi, M. Lub-de Hooge, G.M. van Dam, V. Ntziachristos, L. de Vries, S. Oliveira, P.M.P. van Bergen E. Henegouwen // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. – 2013. – V. 40, №11. – P. 1718–1729.

85. Kirchhofer, A. Modulation of protein properties in living cells using nanobodies / A. Kirchhofer, J. Helma, K. Schmidthals, C. Frauer, S. Cui, A. Karcher, M. Pellis, S. Muyldermans, C.S. Casas-Delucchi, M.C. Cardoso, H. Leonhardt, K.-P. Hopfner, U. Rothbauer // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2010. – V. 17. – P. 133–138.

86. Klee, G.G. Interferences in hormone immunoassays / G.G. Klee // *Clinics in Laboratory Medicine*. – 2004. – V. 24, №1. – P. 1–18.

87. Klooster, R. Improved anti IgG and HSA affinity ligands: clinical application of VHH antibody technology / R. Klooster, B.T.H. Maassen, J.C. Stam, P.W. Hermans, M.R. ten Haaf, F.J.M. Detmers, H.J. de Haard, J.A. Post, C.T. Verrips // *J. Immunol. Meth.* – 2007. – V. 324, №1-2. – P. 1–12.

88. Koch-Nolte, F. Single domain antibodies from llama effectively and specifically block T-cell ecto-ADP-ribosyltransferase / F. Koch-Nolte, J. Reyelt,

B. Schlossow, N. Schwarz, F. Scheuplein, S. Rothenburg, F. Haag, V. Alzogaray, A. Cauerhff, F.A. Goldbaum // *ART2.2 in vivo*. FASEB J. – 2007. – V. 21, №13. – P. 3490–3498.

89. Kopf, M. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice / M. Kopf, H. Baumann, G. Freer, M. Freudenberg, M. Lamers, T. Kishimoto, R. Zinkernagel, H. Bluethmann, G. Köhler // *Nature*. – 1994. – V. 368. – P. 339–342.

90. Kraakman M.J. Blocking IL-6 trans-signaling prevents high-fat diet-induced adipose tissue macrophage recruitment but does not improve insulin resistance / M.J. Kraakman, H.L. Kammoun, T.L. Allen, V. Deswaerte, D.C. Henstridge, E. Estevez, V.B. Matthews, B. Neill, D.A. White, A.J. Murphy, L. Peijs, C. Yang, S. Risis, C.R. Bruce, X.-J. Du, A. Bobik, R.S. Lee-Young, B.A. Kingwell, A. Vasanthakumar, W. Shi, A. Kallies, G.I. Lancaster, S. Rose-John, M.A. Febbraio // *Cell Metab.* – 2015. – V. 21, №3. – P. 403–416.

91. Kratz, F. Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles / F. Kratz // *J. Control. Release*. – 2008. – V. 132, №3. – P. 171–183.

92. Ladenson, R.C., Crimmins D.L., Landt Y., Ladenson J.H. Isolation and characterization of a thermally stable recombinant anti-caffeine heavy-chain antibody fragment / // *Anal Chem.* – 2006. – V. 78. – P. 4501–4508.

93. Larsen, M.T. Albumin-based drug delivery: Harnessing nature to cure disease / M.T. Larsen, M. Kuhlmann, M.L. Hvam, K.A. Howard // *Mol. Cell. Ther.* – 2006. – V. 4, №13. – P. 1–12.

94. Lattanzio, G. Defective development of pristane-oil-induced plasmacytomas in interleukin-6-deficient BALB/c mice / G. Lattanzio, C.

Libert, M. Aquilina, M. Cappelletti, G. Ciliberto, P. Musiani, V. Poli // *Am. J. Pathol.* – 1997. – V. 151, №3. – P. 689–696.

95. Laursen, N.S Universal protection against influenza infection by a multidomain antibody to influenza hemagglutinin / N.S. Laursen, R.H.E. Friesen, X. Zhu, M. Jongeneelen, S. Blokland, J. Vermond, A. van Eijgen, C. Tang, H. van Diepen, G. Obmolova, M. van der Neut Kolfshoten, D. Zuijdgeest, R. Straetemans, R.M.B. Hoffman, T. Nieuwsma, J. Pallesen, H.L. Turner, S.M. Bernard, A.B. Ward, J. Luo, L.L.M. Poon, A.P. Tretiakova, J.M. Wilson, M.P. Limberis, R. Vogels, B. Brandenburg, J.A. Kolkman, I.A. Wilson // *Science.* – 2018. – V. 362, № 6414. – P. 598–602

96. Lauwereys, M. Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy chain antibodies / M. Lauwereys, M. Ghahroudi, A. Desmyter, J. Kinne, W. Holzer, E. De Genst, L. Wyns, S. Muyldermans // *EMBO J.* – 1998. – V. 17, №13. – P. 3512–3520

97. Leduc, C. A highly specific gold nanoprobe for live-cell single-molecule imaging / C. Leduc, S. Si, J. Gautier, M. Soto-Ribeiro, B. Wehrle-Haller, A. Gautreau, G. Giannone, L. Cognet, B. Lounis // *Nano Lett.* – 2013. – V. 13, №4. – P. 1489–1494.

98. Li, N. The unholy trinity: inflammation, cytokines, and STAT3 shape the cancer microenvironment / N. Li, S.I. Grivennikov, M. Karin // *Cancer Cell.* – 2011. – V. 19, №4. – P. 429–431.

99. Liu, J.L. Bioconjugates of rhizavidin with single domain antibodies as bifunctional immunoreagents / J.L. Liu, D. Zabetakis, S.A. Walper, E.R. Goldman, G.P. Anderson // *J. Immunol. Methods.* – 2014. – V. 411. – P. 37–42.

100. Longhi, M.P. Interleukin-6 is crucial for recall of influenza-specific memory CD4 T cells / M.P. Longhi, K. Wright, S.N. Lauder, M.A. Nowell, G.W.

Jones, A.J. Godkin, S.A. Jones, A.M. Gallimore // PLoS Pathog. – 2008. – V. 4, №2. – P. e1000006.

101. Macedo, M.F. Transferrin and the transferrin receptor: of magic bullets and other concerns / M.F. Macedo, M. de Sousa // Inflamm. Allergy Drug Targets. – 2008. – V. 7, №1. – P. 41-52.

102. Marshall, J. Creation of a federated database of blood proteins: a powerful new tool for finding and characterizing biomarkers in serum / J. Marshall, P. Bowden, J.C. Schmit, F. Betsou // Clin. Proteomics. – 2014. – V. 11, №1. – P. 3.

103. Martin, F. Affinity selection of a camelized VH domain antibody inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease / F. Martin, C. Volpari, C. Steinkuhler, N. Dimasi, M. Brunetti, G. Biasiol, S. Altamura, R. Cortese, R. De Francesco, M. Sollazzo // Protein Eng. – 1997. – V. 10, №5. – P. 607–614.

104. McInnes, I.B. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis / I.B. McInnes, G. Schett // Nat. Rev. Immunol. – 2007. – V. 7, №6. – P. 429–442.

105. Moore, P.S. Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV / P.S. Moore, C. Boshoff, R.A. Weiss, Y. Chang // Science. – 1996. – V. 274, №5293. – P. 1739-1744.

106. Mössner, E. Elimination of heterophilic antibody interference in monoclonal sandwich tests / E. Mössner, H. Lenz, G. Bienhaus // Clinical Chemistry. – 1990. – V. 36. – P. 1093.

107. Mroczko, B. Diagnostic usefulness of serum interleukin 6 (IL-6) and C-reactive protein (CRP) in the differentiation between pancreatic cancer and chronic pancreatitis / B. Mroczko, M. Groblewska, M. Gryko, B. Kedra, M. Szmitkowski // J. Clin. Lab. Anal. – 2010. – V. 24, №4. – P. 256–261.

108. Muyldermans, S. Nanobodies: natural single domain antibodies / S. Muyldermans // *Annu. Rev. Biochem.* – 2013. – V. 82. – P. 775–797.
109. Muyldermans, S. Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains / S. Muyldermans, T. Atarhouch, J. Saldanha, J.A.R.G. Barbosa, R. Hamers // *PEDS.* – 1994. – V. 7, №9. – P. 1129–1135.
110. Nakamura, M. Human monoclonal rheumatoid factor-like antibodies from CD5 (Leu-1) B cells are polyreactive / M. Nakamura, S.E. Burastero, A.L. Notkins, P. Casal // *J. Immunol.* – 1988. – V. 140, №12. – P. 4180–4186.
111. Neveu, W.A. IL-6 is required for airway mucus production induced by inhaled fungal allergens / W.A. Neveu, J.B. Allard, O. Dienz, M.J. Wargo, G. Ciliberto, L.A. Whittaker, M. Rincon // *J. Immunol.* – 2009. – V. 183, №3. – P. 1732–1738.
112. Nezlin, R.S. The immunoglobulins: structure and function. / R.S. Nezlin – Academic Press: San Diego, 1998. – pp. 269.
113. Nguyen, V.K. Functional heavy-chain antibodies in Camelidae / V.K. Nguyen, A. Desmyter, S. Muyldermans // *Adv. Immunol.* – 2001. – V. 79. – P. 261–296
114. Nguyen, V.K. Camel heavy-chain antibodies: diverse germline VHH and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire / V.K. Nguyen, R. Hamers, L. Wyns, S. Muyldermans. // *EMBO J.* – 2000. – V. 19, №5. – P. 921–931.
115. Nishimura, K. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis / K. Nishimura, D. Sugiyama, Y. Kogata, D. Tsuji, T. Nakazawa, S. Kawano, K. Saigo,

A. Morinobu, M. Koshiba, K.M. Kuntz, I. Kamae, S. Kumagai // *Annals of Internal Medicine*. – 2007. – V. 146. – P. 797–808.

116. Ohshima, S. Interleukin-6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis / S. Ohshima, Y. Saeki, T. Mima, M. Sasai, K. Nishioka, S. Nomura, M. Kopf, Y. Katada, T. Tanaka, M. Suemura, T. Kishimoto // *PNAS*. – 1998. – V. 95, №14. – P. 8222-8226.

117. Olichon, A. Selection of genetically encoded fluorescent single domain antibodies engineered for efficient expression in *Escherichia coli* / A. Olichon, T. Surrey // *J. Biol. Chem.* – 2007. – V. 282, №50. – P. 36314–36320.

118. Oliveira, S. Rapid visualization of human tumor xenografts through optical imaging with a near-infrared fluorescent anti-epidermal growth factor receptor nanobody / S. Oliveira, G.A.M.S. van Dongen, M. Stigter-van Walsum, R.C. Roovers, J.C. Stam, W. Mali, P.J. van Diest, P.M.P. van Bergen en Henegouwen // *Mol. Imaging*. – 2012. – V. 11, №1. – P. 33–46.

119. Padlan, E.A. Anatomy of the antibody molecule / E.A. Padlan // *Mol. Immunol.* – 1994. – V. 31, №3. – P. 169-217

120. Page, M. Purification of IgG by precipitation with sodium sulfate or ammonium sulfate / M. Page, R. Thorpe // *The Protein Protocols Handbook*, 2nd ed., Ed. Walker J.M. Totowa, N.J. – Humana Press Inc. 2002. – P. 983–984.

121. Panichi, V. Interleukin-6 is a stronger predictor of total and cardiovascular mortality than C-reactive protein in haemodialysis patients / V. Panichi, U. Maggiore, D. Taccola, M. Migliori, G.M. Rizza, C. Consani, Alessio Bertini, S. Sposini, R. Perez-Garcia, P. Rindi, R. Palla, C. Tetta // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2004. – V. 19, №5. – P. 1154–1160.

122. Park, J.Y. Interferences in Immunoassay in Wild DG (ed) / J.Y. Park, L.J. Kricka // *The immunoassay handbook*, 4th edition. – Elsevier, 2013. – P. 403–416.

123. Pleschberger, M. An S-layer heavy chain camel antibody fusion protein for generation of a nanopatterned sensing layer to detect the prostate-specific antigen by surface plasmon resonance technology / M. Pleschberger, D. Saerens, S. Weigert, U.B. Sleytr, S. Muyldermans, M. Sara, E.M. Egelseer // *Bioconjug. Chem.* – 2004. – V. 15, №3. – P. 664–671.

124. Porter, R.R. Structural studies of immunoglobulins / R.R. Porter // *Science*. – 1973. – V. 180, №4087. – P. 713–716.

125. Prieto, D.A. Mass spectrometry in cancer biomarker research: a case for immunodepletion of abundant blood-derived proteins from clinical tissue specimens / D.A. Prieto, D.J. Johann, B.R. Wei, X. Ye, K.C. Chan, D.V. Nissley, R.M. Simpson, D.E. Citrin, C.L. Mackall, W.M. Linehan, J. Blonder // *Biomark. Med.* – 2014. – V. 8, №2. – P. 269–286.

126. Prince, A.M. Specificity of the direct solid-phase radioimmunoassay for detection of hepatitis-B antigen / A.M. Prince, B. Brotman, D. Jass, H. Ikram // *Lancet*. – 1973. – V. 1, №7816. – P. 1346–1350.

127. Puel, A. Recurrent staphylococcal cellulitis and subcutaneous abscesses in a child with autoantibodies against IL-6 / A. Puel, C. Picard, M. Lorrot, C. Pons, M. Chrabieh, L. Lorenzo, M. Mamani-Matsuda, E. Jouanguy, D. Gendrel, J.-L. Casanova // *J. Immunol.* – 2008. – V. 180, №1. – P. 647–654.

128. Rebouissou, S. Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours / S. Rebouissou, M. Amessou, G. Couchy, K. Poussin, S. Imbeaud, C. Pilati, T. Izard, C. Balabaud, P. Bioulac-Sage, J. Zucman-Rossi // *Nature*. – 2009. – V. 457, №7226. – P. 200–204.

129. Rehman, A.A. α -2-Macroglobulin: a physiological guardian / A.A. Rehman, H. Ahsan, F.H. Khan // J. Cell Physiol. – 2013. – V. 228, №8. – P. 1665–1675.
130. Riazi, A. Pentavalent single-domain antibodies reduce *Campylobacter jejuni* motility and colonization in chickens / A. Riazi, P.C.R. Strong, R. Coleman, W.X. Chen, T. Hiram, H. van Faassen, M. Henry, S.M. Logan, C.M. Szymanski, R. Mackenzie, M.A. Ghahroudi // Plos One. – 2013. – V. 8, №12. – P. e83928.
131. Richards, H.B. Interleukin 6 dependence of anti-DNA antibody production: evidence for two pathways of autoantibody formation in pristane-induced lupus / H.B. Richards, M. Satoh, M. Shaw, C. Libert, V. Poli, W.H. Reeves // J. Exp. Med. – 1998. – V. 188, №5. – P. 985–990.
132. Ries, J. A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies / J. Ries, C. Kaplan, E. Platonov, H. Eghlidi, H. Ewers // Nat. Methods. – 2012. – V. 9. – P. 582–584.
133. Ritchie, R.F. Reference distributions for the negative acute-phase serum proteins, albumin, transferrin and transthyretin: a practical, simple and clinically relevant approach in a large cohort / R.F. Ritchie, G.E. Palomaki, L.M. Neveux, O. Navolotskaia, T.B. Ledue, W.Y. Craig // J. Clinical Lab. Anal. – 1999. – V. 13, №6. – P. 273–279.
134. Rohleder, N. Role of interleukin-6 in stress, sleep, and fatigue / N. Rohleder, M. Aringer, M. Boentert // Ann. NY Acad. Sci. – 2006. – V. 1261, №1. – P. 88–96.
135. Romer T. Engineering antibodies and proteins for molecular *in vivo* imaging / T. Romer, H. Leonhardt, U. Rothbauer // Curr. Opin. Biotechnol. – 2011. – V. 22, №6. – P. 882–887.

136. Rothbauer, U. A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins / U. Rothbauer, K. Zolghadr, S. Muyldermans, A. Schepers, M.C. Cardoso, H. Leonhardt // *Mol Cell Proteomics*. – 2008. – V. 7, №2 – P. 282–289.

137. Rothbauer, U. Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies / U. Rothbauer, K. Zolghadr, S. Tillib, D. Nowak, L. Schermelleh, A. Gahl, N. Backmann, K. Conrath, S. Muyldermans, M.C. Cardoso, L. Leonhardt // *Nature Methods*. – 2006. – V. 3. – P. 887–889.

138. Rubel, C. Fibrinogen promotes neutrophil activation and delays apoptosis / C. Rubel, G.C. Fernández, G. Dran, M.B. Bompadre, M.A. Isturiz, M.S. Palermo // *J. Immunol.* – 2001 – V. 166, №3. – P. 2002–2010.

139. Saerens, D. Parallel selection of multiple anti-infectome nanobodies without access to purified antigens / D. Saerens, B. Stijlemans, T.N. Baral, G.T. Nguyen Thi, U. Wernery, S. Magez, P. De Baetselier, S. Muyldermans, K. Conrath // *J. Immunol. Methods*. – 2008. – V. 329, №1-2. – P. 138–150.

140. Saerens, D. Disulfide bond introduction for general stabilization of immunoglobulin heavy-chain variable domains / D. Saerens, K. Conrath, J. Govaert, S. Muyldermans // *J. Molec. Biol.* – 2008. – V. 377, №2. – P 478–488.

141. Saerens, D. Engineering camel single_domain antibodies and immobilization chemistry for human prostate-specific antigen sensing / D. Saerens, F. Frederix, G. Reekmans, K. Conrath, K. Jans, L. Brys, L. Huang, E. Bosmans, G. Maes, G. Borghs, S. Muyldermans // *Anal. Chem.* – 2005. – V. 77, №23. – P. 7547–7555.

142. Saerens, D. Single domain antibodies derived from dromedary lymph node and peripheral blood lymphocytes sensing conformational variants of prostate-specific antigen / D. Saerens, J. Kinne, E. Bosmans, U. Wernery, S.

Muyldermans, K. Conrath // J. Biol. Chem. – 2004. – V. 279, №50. – P. 51965-51972.

143. Saerens, D. Single Domain Antibodies / D. Saerens, S. Muyldermans – Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2012. – 580 pp.

144. Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edition. / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis – Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – 1626 pp.

145. Sambrook, J. Molecular Cloning, 3-Volume Set: A Laboratory Manual, vol. 3. 3rd edition. / J. Sambrook, W. Russel – Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. – 2100 pp.

146. Schett, G. How cytokine networks fuel inflammation: Toward a cytokine-based disease taxonomy / G. Schett, D. Elewaut, I.B. McInnes, J.M. Dayer, M.F. Neurath // Nat. Med. – 2013. – V.19, №7. – P. 8222–8224.

147. Schmidhals, K. Novel antibody derivatives for proteome and high-content analysis / K. Schmidhals, J. Helma, K. Zolghadr, U. Rothbauer, H. Leonhardt // Anal Bioanal. Chem. – 2010. – V. 397, №8. – P. 3203–3208.

148. Screpanti, I. Inactivation of the IL6-gene prevents development of multicentric Castleman's disease in C/EBP β -deficient mice / I. Screpanti, P. Musiani, D. Bellavia, M. Cappelletti, F.B. Aiello, M. Maroder, L. Frati, A. Modesti, A. Gulino, V. Poli // J. Exp. Med. – 1996. – V. 184, №4. – P. 1561–1566.

149. Shen, Z. Single-Chain Fragment Variable Antibody Piezoimmunosensors / Z. Shen, G.A. Stryker, R.L. Mernaugh, L. Yu, H. Yan, X. Zeng // Anal Chem. – 2005. – V. 77, №3. – P. 797-805.

150. Skerra, A. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli / A. Skerra, A Plückthun // Science. – 1988. – V. 240, №4855. – P. 1038-1041.

151. Smith, K.A. IL-6 controls susceptibility to helminth infection by impeding Th2 responsiveness and altering the Treg phenotype *in vivo* / K.A. Smith, R.M. Maizels // Eur. J. Immunol. – 2014. – V. 44, №1. – P. 150–161.

152. Spinelli, S. The crystal structure of a llama heavy chain variable domain / S Spinelli, L Frenken, D Bourgeois, L de Ron, W Bos, T Verrips, C Anguille, C Cambillau, M Tegoni // Nat Struct Biol. – 1996. – V. 3, №9. – P. 752–757.

153. Stahl, E.A. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci / E.A. Stahl, S. Raychaudhuri, E.F. Remmers, G. Xie, S. Eyre, B.P. Thomson, Y. Li, F.A.S. Kurreeman, A. Zhernakova, A. Hinks, C. Guiducci, R. Chen, L. Alfredsson, C.I. Amos, K.G. Ardlie, BIRAC Consortium; A. Barton, J. Bowes, E. Brouwer, N.P. Burt, J.J. Catanese, J. Coblyn, M.J.H. Coenen, K.H. Costenbader, L.A. Criswell, J.B.A. Crusius, J. Cui, P.I.W. de Bakker, P.L. De Jager, B. Ding, P. Emery, E. Flynn, P. Harrison, L.J. Hocking, T.W.J. Huizinga, D.L. Kastner, X. Ke, A.T. Lee, X. Liu, P. Martin, A.W. Morgan, L. Padyukov, M.D. Posthumus, T.R.D.J. Radstake, D.M. Reid, M. Seielstad, M.F. Seldin, N.A. Shadick, S. Steer, P.P. Tak, W. Thomson, A.H.M. van der Helm-van Mil, I.E. van der Horst-Bruinsma, C.E. van der Schoot, P.L.C.M. van Riel, M.E. Weinblatt, A.G. Wilson, G.J. Wolbink, B.P. Wordsworth, YEAR Consortium; C. Wijmenga, E.W. Karlson, R.E.M. Toes, N. de Vries, A.B. Begovich, J. Worthington, K.A. Siminovitch, P.K. Gregersen, L. Klareskog, R.M. Plenge // Nat. Genet. – 2010. – V. 42, №6. – P. 508–514.

154. Steeland, S. Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies / S. Steeland, R.E. Vandenbroucke, C. Libert // Drug Discovery Today. – 2016. – V. 21, №7. – P. 1077–1113.

155. Steiner, M.K. Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension / M.K. Steiner, O.L. Syrkina, N. Kolliputi, E.J. Mark, C.A. Hales, A.B. Waxman // *Circ. Res.* – 2009. – V. 104, №2. – P. 236–244.

156. Sturgeon, C.M. Analytical error and interference in immunoassay: minimizing risk / C.M. Sturgeon, A. Viljoen // *Annals of Clinical Biochemistry.* – 2011. – V. 48 (5). – P. 418–432.

157. Suematsu, S. IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice / S. Suematsu, T. Matsuda, K. Aozasa, S. Akira, N. Nakano, S. Ohno, J. Miyazaki, K. Yamamura, T. Hirano, T. Kishimoto // *PNAS.* – 1989. – V. 86. №19. – P. 7547–7551.

158. Tabares-da Rosa, S. Competitive selection from single domain antibody libraries allows isolation of high-affinity antihapten antibodies that are not favored in the llama immune response / S. Tabares-da Rosa, M. Rossotti, C. Carleiza, F. Carrión, O. Pritsch, K.C. Ahn, J.A. Last, B.D. Hammock, G. González-Sapienza // *Anal Chem.* – 2011. – V. 83, №18. – P. 7213–7220.

159. Tillib, S.V. Formatted single-domain antibodies can protect mice against infection with influenza virus (H5N2) / S.V. Tillib, T.I. Ivanova, L.A. Vasilev, M.V. Rutovskaya, S.A. Saakyan, I.Y. Gribova, I.L. Tutykhina, E.S. Sedova, A.A. Lysenko, M.M. Shmarov, D.Y. Logunov, B.S. Naroditsky, A.L. Gintsburg // *Antiviral Research.* – 2013. – V. 97, №3. – P. 245–254.

160. Tillib, S.V. Single-domain antibody-based ligands for immunoaffinity separation of recombinant human lactoferrin from the goat lactoferrin of transgenic goat milk / S.V. Tillib, M.E. Privezentseva, T.I. Ivanova, L.F. Vasilev, G.A. Efimov, Y.G. Gursky, G.P. Georgiev, I.L. Goldman, E.R. Sadchikova // *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2014. – V. 949–950. – P. 48–57.

161. Turner, K.B. Enhanced stabilization of a stable single domain antibody for SEB toxin by random mutagenesis and stringent selection / K.B. Turner, D. Zabetakis, E.R. Goldman, G.P. Anderson // *Pro. Eng. Design Selec.* – 2014. – V. 27, №3. – P. 89–95.

162. Van der Linden, R.H. Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies / R.H. Van der Linden, L.G. Frenken, B. de Geus, M.M. Harmsen, R.C. Ruuls, W. Stok, L. de Ron, S. Wilson, P. Davis, C.T. Verrips // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1999. – V. 1431, №1. – P. 37–46.

163. Van der Linden, R., de Geus B., Stok W., Bos W., 28. Van Wassenaar D., Verrips T., Frenken L. Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama / R. Van der Linden, B. de Geus, W. Stok, W. Bos, D. Van Wassenaar, T. Verrips, L. Frenken // *J. Immunol. Methods.* – 2000. – V. 240, №1-2. – P. 185–195.

164. Van der Poll, T. Interleukin-6 gene-deficient mice show impaired defense against pneumococcal pneumonia / T. van der Poll, C.V. Keogh, X. Guirao, W.A. Buurman, M. Kopf, S.F. Lowry // *J. Infect. Dis.* – 1997. – V. 76, №2. – P. 439–444.

165. Vaneycken, I. Immuno-imaging using nanobodies / I. Vaneycken, M. D'huyvetter, S. Hernot, J. De Vos, C. Xavier, N. Devoogdt, V. Caveliers, T. Lahoutte // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2011. – V. 22, №6. – P. 877–881.

166. Vaneycken, I. Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer / I. Vaneycken, N. Devoogdt, N. Van Gassen, C. Vincke, C. Xavier, U. Wernery, S. Muyldermans, T. Lahoutte, V. Caveliers // *FASEB J.* – 2011. – V. 25, №7. – P. 2433-2446.

167. Vieira, J. Production of single-stranded plasmid DNA / J. Vieira, J. Messing // *Methods enzymol.* – 1987. – V. 153. – P. 3–11.
168. Warren D.J. Use of an in vivo biotinylated single-chain antibody as capture reagent in an immunometric assay to decrease the incidence of interference from heterophilic antibodies / D.J. Warren, J. Bjerner, E. Paus, O.P. Børner, K. Nustad // *Clinical Chemistry.* – 2005. – V. 51, №5. – P. 830–838.
169. Woods, A. Genetics of inflammation and risk of coronary artery disease: the central role of interleukin-6 / A. Woods, D.J. Brull, S.E. Humphries, S.E. Montgomery // *Eur. Heart J.* – 2000. – V. 21, №19. – P 1574–1583.
170. Wu, A.M. Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates / A.M. Wu, P.D. Senter // *Nat. Biotechnol.* – 2005. – V. 23. – P. 1137–1146.
171. Wu, T.T. Length distribution of CDRH3 in antibodies / T.T. Wu, G. Johnson, E.A. Kabat // *Proteins: Structure, Functions, Bioinformatics.* – 1993. – V. 16, №1. – P. 1–7.
172. Zabetakis, D. Evaluation of disulfide bond position to enhance the thermal stability of a highly stable single domain antibody / D. Zabetakis, M.A. Olson, G.P. Anderson, P.M. Legler, E.R. Goldman // *Plos One.* – 2014. – V. 9, №12. – P. e115405.
173. Zell, R. DNA mismatch-repair in *Escherichia coli* counteracting the hydrolytic deamination of 5-methyl-cytosine residues / R. Zell, H. J. Fritz // *EMBO J.* – 1987. – V. 6, №6. – P. 1809–1185.
174. Zhang, J.B. A pentavalent single-domain antibody approach to tumor antigen discovery and the development of novel proteomics reagents / J. Zhang, Q. Li, T.-D. Nguyen, Ta.-L. Tremblay, E. Stone, R. To, J. Kelly, C.R. MacKenzie // *J. Molec. Biol.* – 2004. – V. 341, №1. – P. 161–169.

175. Zhang, J.B. Pentamerization of single-domain antibodies from phage libraries: A novel strategy for the rapid generation of high-avidity antibody reagents / J. Zhang, J. Tanha, T. Hiram, N.H. Khieu, R. To, H. Tong-Sevinc, E. Stone, J.R. Brisson, C.R. MacKenzie // *J. Molec. Biol.* – 2004. – V. 335, №1. – P. 49–56.

176. Zolghadr, K. Case study on live cell apoptosis-assay using lamin-chromobody cell-lines for high-content analysis / K. Zolghadr, J. Gregor, H. Leonhardt, U. Rothbauer // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – V. 911. – P. 569–575.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю благодарность научному руководителю, заведующему лабораторией молекулярных биотехнологий ФГБУН Институт биологии гена РАН Сергею Владимировичу Тиллибу за помощь в выборе темы, детальное руководство работой и ценные советы по её выполнению. Благодарю заведующего кафедрой иммунологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова Сергея Артуровича Недоспасова за доброе отношение, всестороннюю помощь и поддержку, оказываемую на протяжении всего времени работы над диссертацией. Хочу поблагодарить сотрудников кафедры иммунологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, сотрудников лаборатории молекулярных биотехнологий и сотрудников ФГБУН Института биологии гена РАН, помогавших мне словом и делом.

Благодарю мою семью, особенно маму, Ольгу Владимировну, за бесконечную поддержку, оптимизм и веру в мои силы.