



УДК 577.2:083.3

ПОЛУЧЕНИЕ МИНИ-АНТИТЕЛ ПРОТИВ ГРАНУЛОЦИТАРНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИБЛИОТЕКИ scFv МЫШИ

© 2002 г. А. Г. Ламан^{*,#}, А. О. Шепеляковская^{*}, А. Б. Улитин^{*}, Е. В. Маркова^{***}, Т. Ю. Мареева^{**}, Н. С. Быстров^{**}, Ф. А. Бровко^{*}, В. А. Несмеянов^{**}

^{*}Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, г. Пущино Московской обл., Институтская ул., 6;

^{**}Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

^{***}Красноярский государственный университет

Поступила в редакцию 19.01.2001 г. Принята к печати 10.07.2001 г.

С целью создания фагового дисплея одноцепочечных антител (scFv) из спленоцитов неиммунизированных мышей получены фракции общей клеточной РНК и ДНК. Фрагменты ДНК, кодирующие переменные области легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов, амплифицированы и выделены с использованием праймеров, специфичных к консервативным участкам этих генов. В основу создания библиотеки положен принцип стохастического соединения фрагментов ДНК, кодирующих легкие и тяжелые цепи антител, с помощью ДНК-линкера, соответствующего последовательности аминокислот (Gly₄Ser)₃, в реакции лигирования. Библиотека scFv создана с использованием штамма *E. coli* TG1 и фагмидного вектора рНЕН1. Представительность полученной библиотеки составляла не менее 5×10^7 независимых рекомбинантных клонов. Выделены клоны, продуцирующие антитела к гранулоцитарному колониестимулирующему фактору человека. Охарактеризованы константы аффинности полученных scFv, величины которых для разных клонов варьировали в интервале от 2×10^4 до 1.8×10^7 М⁻¹.

Ключевые слова: антитела одноцепочечные мышинные; фаговый дисплей scFv; аффинная селекция; гранулоцитарный колониестимулирующий фактор.

ВВЕДЕНИЕ

Впервые возможность получения одноцепочечных последовательностей, составленных из переменных доменов антител, в составе гибридного белка оболочки фага была продемонстрирована МакКафферти с сотр. [1]. В этой же работе на примере антител против лизоцима была показана возможность высокоэффективной аффинной селекции клонов, несущих антигенспецифические одноцепочечные антитела (scFv, мини-антитела). В дальнейшем были сконструированы библиотеки, в которых комбинации легких и тяжелых цепей антител продуцировались в составе фагового белка в виде одноцепочечных антител, гетеродимеров или отдельных растворимых молекул [2]. Хотя фаговые антитела из этих библиотек не способны в настоящее время полностью заме-

нить моноклональные антитела, создаваемые с помощью гибридной технологии, они пригодны для получения антигенсвязывающих фрагментов, которые могут быть использованы для иммунодетекции и иммуноаффинного выделения макромолекул. Получение отдельных клонов фагов, специфически реагирующих с определенным антигеном, методически более просто и занимает меньше времени.

В качестве источника нуклеиновых кислот для получения последовательностей ДНК, кодирующих переменные домены иммуноглобулинов, могут служить как периферические лимфоциты крови, так и органы иммунной системы (селезенка, костный мозг, лимфатические узлы). Непременным условием является лишь наличие в используемом биологическом материале зрелых В-лимфоцитов. Для ПЦР-амплификации искомым фрагментов может быть использована и геномная ДНК клеток, и матричная РНК. Применение того или иного типа нуклеиновых кислот в качестве исходного материала не имеет видимых преимуществ друг перед другом в плане разнообразия кодирующих последовательностей. Однако

Сокращения: G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор; DTT – дитиотреит; IPTG – изопропил-β-D-тиогалактопиранозид; PBS – фосфатно-солевой буфер; PEG – полиэтиленгликоль; scFv – одноцепочечные мини-антитела; к.о.е. – колониеобразующая единица.

[#]Автор для переписки (тел./факс: (095) 330-59-74; эл. почта: vnes@ibch.ru).

чаще всего используют РНК, а не ДНК по нескольким причинам. Количество ДНК в одной реакции амплификации должно быть существенно больше для обеспечения достаточного разнообразия вариабельных фрагментов легких и тяжелых цепей Ig ввиду того, что на один клеточный геном приходится лишь одна копия перестроенного иммуноглобулинового локуса, тогда как копияемость мРНК в клетке может быть весьма высокой. Кроме того, использование больших количеств геномной ДНК в ПЦР приводит к увеличению вязкости раствора, что может неблагоприятно отразиться на результатах эксперимента. Поэтому геномная ДНК для создания библиотек scFv используется редко.

Цель данной работы – создание фагового дисплея мышинных одноцепочечных антител и его использование для получения мини-антител к гранулоцитарному колониестимулирующему фактору человека. G-CSF – цитокин, стимулирующий рост гранулоцитов и активирующий нейтрофилы [3]. Он представляет собой O-гликозилированный полипептид (M 19 кДа) и, в отличие от гранулоцитарного макрофагального колониестимулирующего фактора, действующего на более ранней стадии гемопоэза, обнаруживается в кровотоке. G-CSF применяется в онкологии для восстановления числа нейтрофилов при лейкопении, вызванной радио- или химиотерапией.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из селезенок 3 мышей были выделены клетки, представляющие собой смешанную популяцию, содержащую наряду с В- и Т-лимфоцитами эритроциты, клетки соединительной ткани и др. Поэтому мы использовали обогащение мононуклеарными клетками путем центрифугирования спленоцитов в градиенте фикол-триомбрат (d 1.077). В результате было получено порядка 10^8 клеток, большая часть которых представлена клетками лимфоидного ряда. Из этой фракции клеток выделяли РНК и ДНК для последующей амплификации вариабельных участков антител. Суммарно было выделено РНК около 100 и ДНК – 200 мкг.

Для создания фагового дисплея мини-антител необходимо выделить и амплифицировать большое число разнообразных фрагментов ДНК, кодирующих вариабельные области как легких, так и тяжелых цепей Ig. Выбор олигонуклеотидов для амплификации таких фрагментов диктуется первичной структурой вариабельных областей иммуноглобулинов. Вариабельные фрагменты легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов состоят из каркасных (FR) и гипервариабельных участков (CDR), причем аминокислотные последовательности каркасных участков высоко гомологичны и для легких, и для тяжелых цепей Ig, в то время как относительно короткие (4–15 а.о.) гипервариабельные области не имеют между собой какой-

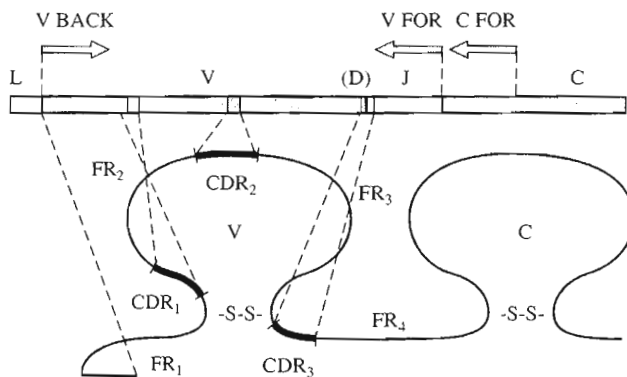


Рис. 1. Схема взаимного расположения участков отжига антителоспецифических праймеров на мРНК и кодируемого фрагмента Ig. V BACK и V FOR – обобщенные обозначения праймеров VH1BACK, Vκ2BACK и VH1FOR-2, Vκ4FOR соответственно, которые использовались для амплификации кодирующих последовательностей Ig; C FOR – обобщенное обозначение праймеров CH1FOR и CκFOR, которые использовались для синтеза первой цепи кДНК.

либо существенной гомологии [4]. Участки ДНК, кодирующие вариабельные фрагменты антител в зрелых В-клетках, имеют на 3'-конце последовательность, соответствующую J-сегменту, который в свою очередь участвует в формировании CDR3, но высоко консервативен в 3'-концевой области и отделен от сегмента, кодирующего константный фрагмент, интроном.

Ввиду относительно высокой консервативности участка FR1 и J-сегментов, соответствующие им олигонуклеотиды могут быть использованы в качестве праймеров для амплификации геномной ДНК или кДНК В-лимфоцитов. Несмотря на высокую гомологию аминокислотных последовательностей указанных фрагментов, нуклеотидные последовательности, их кодирующие, отличаются довольно существенно. Поэтому выбор праймеров обусловлен необходимостью их гомологии с FR1- и J-сегментами.

Мы при синтезе праймеров опирались на данные, приведенные в работах [5–7]. Некоторые авторы [8] рекомендуют синтезировать в качестве праймеров дополнительный ряд олигонуклеотидов для более полного охвата последовательностей вариабельных областей. Однако нам представляется достаточным набор из 32 олигонуклеотидов, кодирующих FR1-участки, и 4 вариантов J-сегментов генов иммуноглобулинов. Участки отжига праймеров на мРНК и структура кодируемого фрагмента Ig схематически изображены на рис. 1.

Для синтеза первой цепи кДНК тяжелой цепи IgG использовали праймер CH1FOR, легкой цепи – олигонуклеотид CκFOR (структуры праймеров см. “Эксперимент. часть”). Эти олигонуклеотиды частично захватывают прилегающий к J-сегменту фрагмент гена первого константного домена тяжелой (γ) и легкой (κ) цепей иммуноглобули-

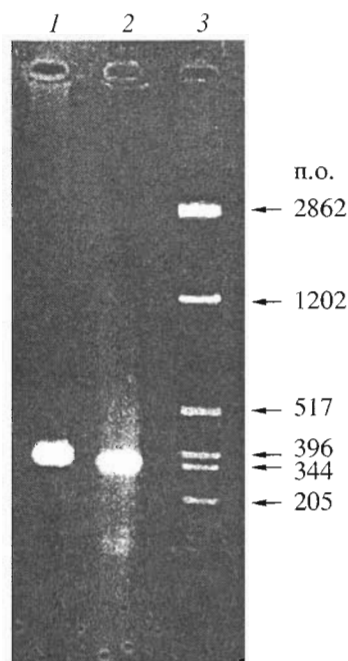


Рис. 2. Электрофореграмма фрагментов ДНК, полученных в результате ПЦР: амплификация фрагментов, соответствующих V-областям тяжелых (1) и легких (2) цепей Ig; 3 – маркеры длин ДНК: pTZ19R/EcoRI + pTZ19R/HinfI.

нов. Так как более 90% легких цепей иммуноглобулинов мыши представлены κ-цепями, последовательности, кодирующие λ-цепи, не применяли при синтезе кДНК легких цепей.

Для амплификации V-генов тяжелых цепей иммуноглобулинов мыши синтезировали пару праймеров: VH1FOR-2, который комплементарен последовательности мРНК, кодирующей J-сегмент, и VH1BACK, соответствующий последовательности мРНК, кодирующей участок FR1 иммуноглобулина мыши. Для амплификации легких цепей (κ) Ig мыши использовали праймеры Vκ4FOR и Vκ2BACK, которые комплементарны последовательностям мРНК, кодирующим соответственно J-сегменты и FR1-участки κ-цепей Ig мыши.

Для синтеза первой цепи кДНК проводили 4 реакции обратной транскрипции с 20 мкг РНК в каждой. Реакционную смесь после синтеза кДНК использовали для амплификации фрагментов тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов. При этом амплификация фрагментов легких цепей успешно происходила с 1/10 частью реакционной смеси после обратной транскрипции. Для амплификации же фрагментов тяжелых цепей необходимо было брать не менее 1/3 реакционной смеси. Таким образом, полученный препарат РНК был использован в десяти независимых реакциях амплификации фрагментов тяжелых цепей и девяти реакциях амплификации фрагментов легких цепей. Это позволило накопить их в количестве, достаточном для клонирования.

С целью увеличения представительности вариабельных фрагментов в популяции амплифицированной ДНК мы использовали в качестве матрицы как кДНК, так и геномную ДНК. В случае геномной ДНК нами было проведено по 50 независимых ПЦР для легких и тяжелых цепей. Для каждой реакции брали по 300 нг ДНК, что по данным теоретических расчетов соответствует количеству ДНК, которое содержится в $(1-5) \times 10^5$ клеток. Количество амплифицированных фрагментов в пересчете на одну реакцию амплификации существенно не различалось для опытов с использованием геномной ДНК или кДНК. Однако ввиду нестабильности РНК в процессе ее выделения и дальнейших манипуляций часть молекул РНК могла деградировать, понижая тем самым представительность ее амплифицированных фрагментов по сравнению с исходным материалом. На наш взгляд, параллельное использование для ПЦР-амплификации как ДНК, так и РНК оправдано с точки зрения охвата максимального разнообразия последовательностей, кодирующих вариабельные фрагменты иммуноглобулинов, и уменьшения количества проводимых реакций амплификации.

Первые опыты по амплификации кДНК и геномной ДНК показали, что кроме целевых последовательностей амплифицируется еще ряд последовательностей иной длины. Это, по-видимому, обусловлено тем, что используемые праймеры имели довольно высокую степень вырожденности и могли отжигаться не только на строго гомологичных участках ДНК. Для преодоления этого осложнения мы повысили температуру отжига на первых циклах ПЦР на 10°C выше расчетной. В этом случае, разумеется, падает доля гибридирующихся с кДНК (или геномной ДНК) праймеров, но обеспечивается более высокая селективность в сравнении с теми, которые гибридизуются некорректно. После такой процедуры вместо набора полос разной интенсивности на электрофореграмме была получена одна мажорная полоса, соответствующая фрагменту расчетного размера, с малоинтенсивными полосами, соответствующими другим фрагментам (рис. 2). В подобных условиях ни один из генов V-фрагментов тяжелых и легких цепей не имеет селективного преимущества перед другим и не происходит неспецифической амплификации посторонних последовательностей. Такой подход был особенно существенен при амплификации ДНК вариабельных областей тяжелых цепей, поскольку именно в этом случае наблюдался очень высокий уровень неспецифического синтеза как в случае кДНК, так и в случае геномной ДНК.

Продукты амплификации ДНК легких и тяжелых цепей вариабельных областей иммуноглобулинов анализировали в 2% агарозном геле. Фрагменты амплифицированной ДНК нужных размеров выделяли после препаративного разделения в легкоплавкой агарозе методом электроэлюции. В ре-

зультате было получено 10.5 и 8.5 мкг ДНК-фрагментов соответственно легкой и тяжелой цепей.

Для объединения фрагментов легких и тяжелых цепей традиционно используется линкер (Gly_4Ser)₃. Для создания такой конструкции были синтезированы олигонуклеотиды JH-link и FRk-link. 3'-Концевая область олигонуклеотида JH-link комплементарна 3'-концевой области олигонуклеотида FRk-link. В результате отжига и достройки с помощью фрагмента Кленова мы получили фрагмент двухцепочечной ДНК длиной 94 п.о. С одной стороны, эта ДНК несет последовательность 5'-концевой области J-сегмента тяжелой цепи иммуноглобулинов (V_H), а с другой – 3'-концевой области, кодирующей FR1-домен легкой цепи (V_L). ДНК, кодирующие фрагменты антител, были объединены посредством линкерного участка с помощью ПЦР (рис. 3). Полученные конструкции были пригодны для клонирования в *E. coli* в составе подходящего вектора и кодировали scFv-фрагменты с последовательностями V_H -linker- V_L .

В качестве вектора для создания библиотеки мы выбрали фагмиду pHEN1. Наш выбор был обусловлен несколькими факторами: данная фагмида обеспечивает довольно высокий уровень экспрессии гена scFv в составе гибридного белка с gIII фага fd; она может реплицироваться как обычная плазмида, а также, благодаря наличию *ori* фага fd, может реплицироваться и, в случае ко-трансфекции фагом-помощником, упаковываться в фаговые частицы; при комплементации в присутствии фага-помощника одна копия рекомбинантного белка будет включаться в состав вирусной частицы, что не сказывается на инфекционности последней; данный вектор позволяет получать секретлируемые scFv при клонировании в несупрессорные штаммы.

Фрагменты ДНК, кодирующие scFv, были лигированы с вектором по сайтам рестрикции *Sfi*I и *Not*I. Условия лигирования подбирались таким образом, чтобы его эффективность составляла не менее 90% (электрофоретический анализ продуктов, рис. 4). Для клонирования был использован штамм *E. coli* TG1 с эффективностью трансформации не менее 10^9 к.о.е. на 1 мкг pHEN1.

Было проведено 80 электропораций с использованием 10 лигазных смесей. Для каждой электропорации выход трансформантов составлял $(0.5-2) \times 10^6$. В результате была получена библиотека scFv представительностью не менее 5×10^7 независимых клонов. Эта библиотека была амплифицирована и использована в виде фаговых частиц для получения антител против гранулоцитарного колониестимулирующего фактора.

Клоны-продукты отбирают, как правило, проводя от 2 до 5 раундов селекции. Для выделения наиболее специфичных и высокоаффинных антител на каждом последующем этапе отбора желательно уменьшать концентрацию лиганда и время инкубации с ним фагмидных частиц. Для

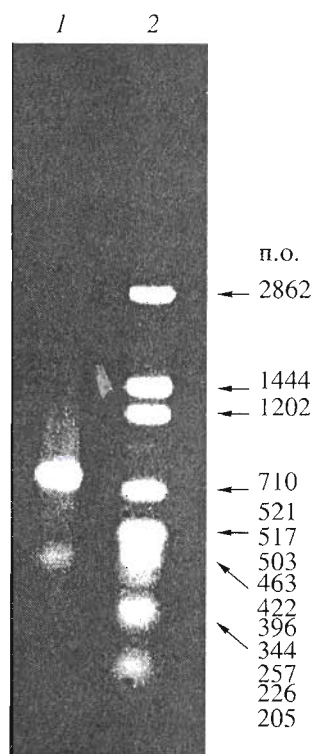


Рис. 3. Электрофореграмма продукта объединения с помощью линкера фрагментов ДНК, кодирующих легкие и тяжелые цепи Ig: 1 – амплифицированная ДНК, кодирующая scFv; 2 – маркеры длин ДНК: pTZ19R/*Eco*RI + pTZ19R/*Hinf*I + pTZ19R/*Alu*I + pTZ19R/*Taq*I.

выделения антител против G-CSF мы провели 4 раунда селекции, постепенно уменьшая концентрацию G-CSF на каждом последующем этапе от 10^{-6} до 10^{-8} М. Обогащенную таким образом библиотеку рассеивали на агаризованную среду с плотностью примерно 500 колоний на одну чашку Петри. Колонии анализировали с помощью биотинилированного G-CSF. Клоны, которые давали наиболее яркий сигнал, были использованы в дальнейшей работе.

Для удобства анализа и выделения scFv к G-CSF в 3'-концевую область отобранных клонов scFv был введен участок, кодирующий олигопептид, узнаваемый имеющимися у нас моноклональными антителами ЛНKB-2, специфичными к фрагменту 59–72 интерлейкина-2 человека. Экспрессируемые конструкции были проанализированы на связывание с G-CSF и антителами ЛНKB-2. Колонии, продуцирующие scFv и дающие положительный сигнал в обоих тестах, были использованы для определения константы аффинности мини-антител методом непрямого иммуноферментного анализа. Для проанализированных мини-антител, секретлируемых клетками *E. coli* в периплазматическое пространство и культуральную среду, значения K_a составляли от 0.2×10^5 до

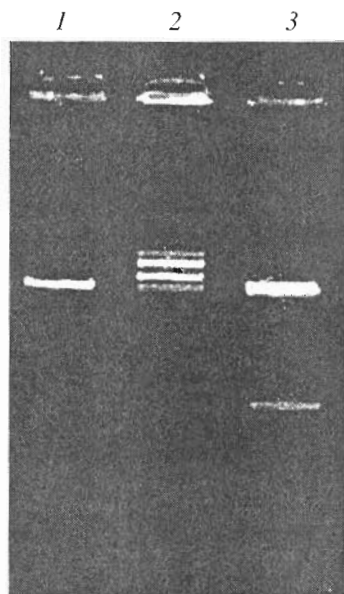


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов лигирования ДНК scFv с ДНК вектора: 1 – самолигирование векторной ДНК; 2 – лигирование ДНК вектора с ДНК scFv; 3 – векторная ДНК и ДНК scFv.

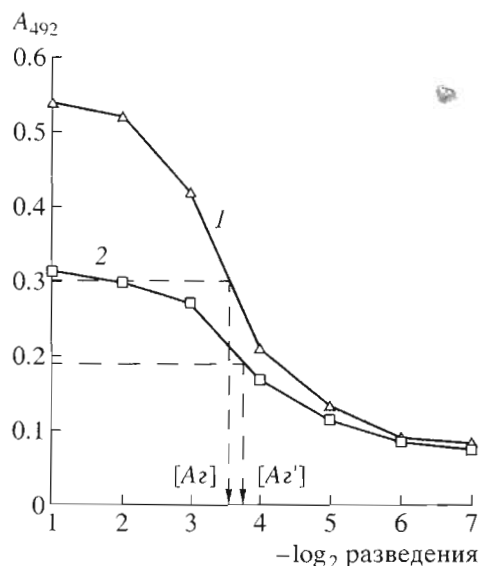


Рис. 5. Определение константы аффинности scFv клона 9₆ методом непрямого ИФА. Кривые титрования G-CSF при концентрации scFv 5 (1) и 2.5 мкг/мл (2). $[A_2] = 0.835 \times 10^{-7}$, $[A_2'] = 0.7 \times 10^{-7}$ М. $K_a = 1.8 \times 10^7$ М⁻¹.

1.8×10^7 М⁻¹. Мини-антитела с наибольшей аффинностью продуцировались клетками клона 9₆. Кривые титрования представлены на рис. 5.

Для фагмидных библиотек размером 10^7 – 10^8 клонов типично получение высокоспецифичных, но низкоаффинных антител с константами аффинности порядка 10^6 М⁻¹. Однако в нашем случае были получены антитела с K_a 1.8×10^7 М⁻¹. Это может быть объяснено условиями отбора

рекомбинантных фагмид, а именно низкой концентрацией лиганда на последней стадии отбора (10^{-8} М) и уменьшением времени инкубации лиганда с фагвыми частицами от 2 ч для первого раунда обогащения до 15 мин на последнем. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что даже в библиотеке scFv сравнительно небольшой представительности присутствуют среднеаффинные антитела, однако для их обнаружения и выделения требуются жесткие методы отбора клонов.

Таким образом, нами получена фагмидная библиотека мини-антител представительностью около 5×10^7 независимых клонов и продемонстрирована возможность ее использования для получения мини-антител, имеющих K_a порядка 10^7 М⁻¹.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. Моноклональное антитело ЛНKB-2 было получено ранее в лаборатории иммунохимии ИБХ РАН [9]. В работе использовались ферменты фирмы “Сибэнзим” (Новосибирск), агароза DNA grade Amersham Pharmacia Biotech, соли “хч” или “ос.ч” российского производства.

Олигонуклеотиды и праймеры* были синтезированы в ИБХ РАН Н.С. Быстровым (5' → 3'):

СН1FOR – эквимольная смесь

СТСААТТТТСТТГТССАССТТГТТГС,
СТСГАТТСТТТГАТСААСТСАГТСТ,
ТГГААТГГГСАСАТГСАГАТСТСТ.

Ск4FOR: СТСАТТССТТТГААГСТТТГАС.

ВН1ВАКС: АГГТSMARCTGCAGSAGTCWGG.

Вк2ВАКС: GACATTTGAGCTCACCCAGTCTC-
СА.

Вк4FOR – эквимольная смесь

ССГТТТГАТТТССАГСТТГГТГСС,
ССГТТТТАТТТССАГСТТГГТССС,
ССГТТТТАТТТССААСТТТГТССС,
ССГТТТСАГСТТССАГСТТГГТССС.

ВН1FOR-2: TGAGGAGACGGTGACCGTGT-
GTCCCTTGGCCS.

ВН1ВАКСF1: CATGCCATGACTCGCGGC-
CCAGCCGGCCATGGCCSAGGAGGTSMARCTG-
CAGSAGTCWGG.

Вк4FORNOT – эквимольная смесь

GAGTCATTCTGCGGCCGCCCGTTTGAТТТ-
CAGCTTGGTГСС,

GAGTCATTCTGCGGCCGCCCGTTTТАТТТ-
CAGCTTGGTГССС,

GAGTCATTCTGCGGCCGCCCGTTTТАТТТ-
СААСТТТГТССС,

* Обозначения соответствуют номенклатуре IUPAC: S (G или C), M (A или C), R (A или G), W (A или T), Y (T или C).

GAGTCATTCTGCGGCCGCCCCGTTTCAGCTC-
CAGCTTGGTCCC.

JH-link:

GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGCG-
GTGGCTTGGGCGGTGGTGGGTCCG.

FRκ-link:

TGGAGACTGGGTGAGCTCAATGTCAGATC-
CGCCGCCACCCGACCCACCACCGCC.

Олигонуклеотиды, используемые для создания адаптора, кодирующего антигенную детерминанту интерлейкина-2 для ЛНKB-2:

GGCCGCACTAGAAGAAGAACTCAAACSTC-
TGGAGGAAGTGCTAAATTTACA;

GGCCTGTAATTTAGCACTTCCSTCCAGAGG-
TTTGAGTTCTTCTTAGTGC.

Для выделения моонуклеарных клеток у мышей линии Valb/c в возрасте 2 мес. и весом 20 г извлекали селезенку и измельчали ее в гомогенизаторе со стеклянным пестиком в буфере следующего состава: 50 мМ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 150 мМ NaCl, pH 7.6 (PBS). Взвесы клеток (10^7 клеток/мл) наслаивали на раствор фикола (d 1.077) в соотношении суспензия клеток–фикол (3 : 1) и центрифугировали при 1500g в течение 15 мин при комнатной температуре. Интерфазу, содержащую моонуклеарные клетки, отбирали и промывали 2 раза PBS [10]. Для выделения РНК (ДНК) использовали лимфоциты, выделенные из селезенок трех мышей.

Для выделения РНК клетки суспендировали в 1 мл раствора, содержащего 4 М гуанидинийроданид, 2% саркозил, 0.2 М 2-меркаптоэтанол. Лизат выдерживали при 60°C в течение 10 мин, затем добавляли равный объем фенола, pH 4.0, 1/2 объема 1 М CH_3COONa , pH 4.0, 1/2 объема хлороформа и энергично встряхивали. Смесь охлаждали до 4°C, затем центрифугировали при 3000g в течение 10 мин. Водную фазу отбирали и экстрагировали смесью фенол–хлороформ (1 : 1) до исчезновения интерфазы. К водной фазе добавляли 3 объема этанола и смесь выдерживали при температуре –20°C в течение 2 ч. РНК осаждали центрифугированием при 10000g в течение 30 мин. Осадок промывали 70% этанолом и после центрифугирования растворяли в 100 мкл воды, не содержащей РНКаз. К раствору РНК добавляли LiCl до концентрации 3 М, выдерживали в течение ночи при 0°C. Осадок высокомолекулярной РНК отделяли центрифугированием, растворяли в 100 мкл 0.3 М ацетата натрия, pH 5.0 и разделяли на 5 равных частей. В каждую пробирку добавляли 2.5 объема этанола. Препараты РНК хранили в спирте при –20°C. Для оценки качества и количества выделенной РНК использовали одну порцию препарата. РНК осаждали центрифугированием, растворяли в 100 мкл воды, для электрофореза использовали 2, 5, 10 и 20 мкл полученного препарата.

Для выделения ДНК клетки селезенки суспендировали в PBS, охлажденном во льду, в концентрации 10^8 клеток/мл, добавляли 10 объемов раствора, содержащего 0.5 М EDTA, pH 8.0, 100 мкг/мл протеиназы К и 0.5% саркозил. Суспензию лизированных клеток помещали в водяную баню с температурой 50°C на 3 ч, периодически перемешивая. ДНК трижды экстрагировали, аккуратно, без резких встряхиваний, равным объемом фенола. После третьей экстракции ДНК диализовали против 4 л раствора 50 мМ Трис-НСl, pH 8.0 с 10 мМ EDTA, 10 мМ NaCl, меняя буфер до тех пор, пока оптическое поглощение диализата при длине волны 270 нм не стало менее 0.05. К препарату ДНК добавляли ацетат натрия до конечной концентрации 0.3 М и 0.6 объема изопропанола. Высокомолекулярную ДНК собирали, наматывая ее на стеклянную палочку, промывали 70% этанолом, подсушивали на воздухе, затем в течение ночи растворяли в буфере TE (10 мМ Трис-НСl, 1 мМ EDTA, pH 8.0) при 4°C [11]. Количество выделенной ДНК определяли спектрофотометрически при 260 нм.

Для синтеза первой цепи кДНК тяжелой цепи Ig использовали праймер CH1FOR, легкой цепи – олигонуклеотид СкFOR. 20 мкг РНК (одну аликвоту) растворяли в 68 мкл 1 мМ раствора ванадилрибонуклеозидных комплексов, добавляли 5 мкл 5 мМ смеси dNTP, 5 мкл 0.1 М DTT, 20 пмоль CH1FOR, 20 пмоль СкFOR, 10 мкл 10хбуфера для ревертазы (Amersham, Англия). Смесь прогревали 5 мин при 67°C, затем медленно охлаждали до комнатной температуры, добавляли 4 мкл RNasin (Amersham, Англия) до 0.5 ед./мкл и 4 мкл обратной транскриптазы AMV-RT (20 ед./мкл, Amersham, Англия). Смесь инкубировали 1 ч при 42°C.

Для амплификации переменных областей тяжелых цепей Ig использовали пару праймеров VH1FOR-2 и VH1BACK, легких цепей (κ) – праймеры Vκ4FOR и Vκ2BACK. Для амплификации тяжелых цепей брали 30 мкл (1/3 об.) смеси, полученной после синтеза первой цепи кДНК, для легких цепей – 10 мкл (1/10 об.) смеси. Амплификацию проводили в реакционной смеси следующего состава: первая цепь кДНК, праймеры (10 мкМ для тяжелой цепи и 30 мкМ для легкой цепи), 0.25 мМ dNTP, 50 мМ KCl, 2 мМ MgCl_2 , 50 мМ Трис-НСl, pH 9.0, 0.02% Твин-20, 5 ед. акт. Taq-полимеразы в объеме 100 мкл. Для уменьшения неспецифической амплификации проводили 5 циклов амплификации в режиме: денатурация – 94°C, 1 мин, отжиг – 1 мин, элонгация – 74°C, 2 мин. Стадия отжига проводилась при следующих значениях температуры: t_1 65, t_2 64, t_3 63, t_4 62, t_5 61°C. Далее проводили 30 циклов амплификации при температуре отжига 60°C и тех же временных параметрах. Продукты амплификации анализировали электрофоретически в 2% агарозном геле.

Амплификацию переменных областей Ig с геномной ДНК спленоцитов мыши проводили в тех же условиях и с использованием тех же прай-

меров, что и для амплификации кДНК. При этом отпадала необходимость синтеза кДНК. Для одной реакции использовали 300 нг ДНК. Амплифицированные фрагменты анализировали так же, как описано выше.

ДНК линкера для соединения фрагментов тяжелых и легких цепей получали путем отжига и сборки с использованием фрагмента Кленова двух олигонуклеотидов: JH-link и FRk-link. Для отжига брали по 500 пмоль олигонуклеотидов JH-link и FRk-link, 10 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 5 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl и 50 мМ dNTP в общем объеме 50 мкл. Смесь нагревали до 90°C, инкубировали 5 мин, затем медленно в течение 0.5 ч температуру понижали до 50°C, инкубировали 20 мин и немедленно охлаждали, поместив пробирку в лед. К смеси добавляли 10 ед. акт. фрагмента Кленова и инкубировали 20 мин при 37°C. По окончании реакции в пробирку добавляли EDTA до конечной концентрации 0.5 мМ. Для удаления фрагмента Кленова смесь экстрагировали равным объемом фенола. Затем добавляли ацетат натрия до конечной концентрации 0.3 М и равный объем изопропанола. ДНК осаждали центрифугированием при 30000g и температуре 4°C.

ДНК линкера очищали электрофорезом в 10% ПААГ (29 : 1) в неденатурирующих условиях (0.089 М Трис-борат, 0.089 М борная кислота, 0.002 М EDTA, рН 8.0). После окончания разделения гель помещали в раствор, содержащий 0.5 мкг/мл бромистого этидия в этом же буфере. После 45 мин окрашивания пятно, соответствующее ДНК линкера, визуализировали в УФ-свете и вырезали соответствующий участок геля. Кусочек геля, содержащий ДНК, гомогенизировали в пробирке, добавляли равный объем элюирующего буфера (0.5 М ацетат аммония, 1 мМ EDTA, рН 8.0) и инкубировали в течение ночи при 37°C. Пробу центрифугировали при 10000g в течение 20 мин при комнатной температуре, отбирали надосадочную жидкость, осадок еще раз экстрагировали равным объемом того же буфера. Два супернатанта объединяли и фильтровали через ватман 3 ММ. ДНК осаждали центрифугированием после добавления 2 объемов этанола. Осадок растворяли в 400 мкл ТЕ, количество ДНК определяли по величине оптического поглощения при длине волны 260 нм [11].

ПЦР-амплификацию для сборки тяжелых и легких цепей Ig проводили в реакционной смеси, содержащей буфер для Taq-полимеразы, 2.5 мМ MgCl₂, 30 мкМ праймеры VH1BACK и VK4FOR, 20 нг ДНК линкера, по 100 нг амплифицированных легких и тяжелых цепей, 250 мкМ dNTP и 1 ед. акт. Taq-полимеразы. Двадцать пять циклов амплификации проводили в следующем режиме: 94°C – 1.5 мин, 72°C – 2.5 мин. Продукты амплификации анализировали после электрофоретического разделения в 2% агарозном геле. Фрагмент

размером 800–900 п.о. выделяли с помощью электроэлюции.

Для внесения сайтов рестрикции *Sfi*I и *Not*I проводили 15 циклов ПЦР-амплификации с использованием в качестве матрицы фрагментов ДНК, полученных на предыдущем этапе, и праймеров VH1BACKSFI и VK4FORNOT. Циклы амплификации проводили в следующем режиме: 94°C – 1 мин, 50°C – 1 мин, 74°C – 1.5 мин. Амплифицированный фрагмент выделяли после электрофоретического разделения продуктов реакции в 2% агарозном геле.

Рестрикцию ДНК scFv и ДНК рHEN1 по сайту SfiI проводили в реакционной смеси, содержащей в 50 мкл ДНК (5 мкг рHEN1 или 1 мкг scFv), буфер для *Sfi*I, 0.1 мг/мл BSA и 20 ед. акт. *Sfi*I. Реакционные смеси инкубировали 4 ч при 56°C, затем добавляли 39 мкл воды, 5 мкл 1М NaCl, 5 мкл 10хбуфера для *Not*I и 20 ед. акт. *Not*I. После инкубации в течение 4 ч при 37°C ДНК плазмиды рHEN1 подвергали дефосфорилированию при помощи Shrimp Alkaline Phosphatase (USB) согласно инструкции фирмы-производителя. После выполнения этих процедур гидролизованные фрагменты ДНК scFv и рHEN1 очищали электрофоретически в 1% агарозном геле.

Для одной реакции лигирования ДНК scFv с вектором рHEN1 использовали 200 нг гидролизованной ДНК scFv и 1 мкг вектора рHEN1, буфер для T4-ДНК-лигазы, 1 мМ АТФ, 100 мкг/мл BSA и 20 ед. акт. T4-ДНК-лигазы (Weiss). Лигирование осуществляли в течение 2 ч при комнатной температуре в объеме 50 мкл. После фенольной депротенинизации лигазной смеси ДНК осаждали этанолом и хранили в спирте при –20°C до момента использования в электротрансформации клеток *E. coli*.

Для приготовления компетентных клеток культуру клеток *E. coli* штамма TG1 выращивали на среде 2хYT (в 1 л: 16 г гидролизата лактальбумина, 10 г дрожжевого экстракта и 5 г NaCl) при 37°C и интенсивной аэрации до концентрации, соответствующей A₆₀₀ 0.5. Культуру охлаждали во льду 30 мин, затем клетки осаждали центрифугированием при 4°C в течение 15 мин при 3000g. Осадок суспендировали в охлажденном 10% глицерине, приготовленном на воде milliQ, в объеме, равном исходному объему культуральной жидкости. Процедуру повторяли два раза, после чего клетки суспендировали в 10% глицерине, в объеме, равном 1/1000 объема исходной культуральной жидкости. Суспензию клеток разливали в пробирки по 50 мкл, замораживали при температуре жидкого азота и хранили при –70°C.

Электропорацию проводили в 0.2 см-кюветах с использованием 50 мкл суспензии компетентных клеток и 50–100 нг ДНК, полученной после переосаждения лигазной смеси. Немедленно после электрического импульса (2500 В) в кювету добавляли 1 мл среды 2хYT, содержащей 1% глюкозу и 10 мМ MgCl₂, клетки аккуратно суспенди-

ровали, переносили в стерильные пробирки и инкубировали в течение 1 ч при 37°C.

Аmplификация библиотеки. После электропорации клетками инокулировали 200 мл среды 2xYT с 1% глюкозой и 100 мкг/мл ампициллина, отбирали аликвоту для определения титра трансформантов, а оставшуюся часть инкубировали в течение ночи при 37°C. На следующий день отбирали аликвоту ночной культуры (2 мл) и инокулировали ею 200 мл указанной выше среды. Клетки растили до $A_{600} \approx 0.5$, после чего 5 мл культуры переносили в колбу с 20 мл той же среды, добавляли $(0.5-1) \times 10^{11}$ к.о.е. фага M13 K07 и инкубировали 1.5 ч при 37°C. Клетки осаждали при 4000g в течение 10 мин, суспендировали в 10 мл среды 2xYT и добавляли к 300 мл среды 2xYT, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл канамицина. Инкубацию проводили при интенсивной аэрации в течение ночи при 37°C.

Выделение фагмидных частиц. Культуру клеток *E. coli*, содержащую рекомбинантную плазмиду pHEN1 и фаг M13 K07, выращенную в течение ночи, центрифугировали 10 мин при 8000g. К супернатанту добавляли 1/5 объема смеси PEG/NaCl (20% PEG-6000, 2.5 M NaCl) и инкубировали 1 ч при 4°C. После центрифугирования образовавшийся осадок суспендировали в 1/10 объема буфера TE и еще раз осаждали смесью PEG/NaCl в аналогичных условиях. Осадок ресуспендировали в 1/100 объема буфера TE, отделяли нерастворимые агрегаты центрифугированием и определяли титр фагмидных частиц после трансдукции и посева на агаризованную среду с ампициллином.

Биотинилирование G-CSF. К раствору рекомбинантного человеческого G-CSF (0.3 мг/мл) в 0.1 M Na-карбонат/бикарбонатном буфере, pH 9.5, добавляли 70 mM *N*-оксисукцинимидный эфир биотина в диметилформамиде в мольном соотношении белок-эфир биотина $\approx 1 : 3$ и инкубировали 2 ч при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 1 M NH_4Cl (20 мкл NH_4Cl на 1 мг белка). Реакционную смесь диализовали против 1000 объемов PBS.

Селекция G-CSF-специфичных клонов и трансдукция клеток *E. coli*. Раствор стрептавидина в 0.1 M Na-карбонат/бикарбонатном буфере, pH 9.5 (10 мкг/мл), распределяли по 100 мкл в лунки 96-луночного планшета для ИФА, инкубировали в течение ночи при 4°C, после чего в лунки вносили по 100 мкл смеси, содержащей 1% BSA и 5% лошадиной сыворотки в PBS и инкубировали еще 2 ч при 4°C. Между стадиями планшет промывали 5 раз PBS, затем 5 раз PBS с 0.1% Твин-20.

10^{12} к.о.е. фагмидной библиотеки в объеме 100 мкл инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч с биотинилированным G-CSF в концентрации 2 мкг/мл для первого раунда, 200, 100 и 10 нг/мл для второго, третьего и четвертого, соответственно. Смесь, содержащую scFv-фагмидные частицы, прединкубированные с биоти-

нированным G-CSF, вносили в лунки планшета с иммобилизованным стрептавидином и оставляли при комнатной температуре на 1 ч при умеренном перемешивании на орбитальном шейкере. С целью удаления неспецифически сорбированных фагмидных частиц после инкубации планшет промывали как описано выше. Для диссоциации комплекса стрептавидин-биотинилированный G-CSF – scFv в лунки добавляли по 100 мкл 0.2 M буфера глицин-HCl, pH 2.0, инкубировали 5 мин при комнатной температуре, после чего содержимое лунок переносили в пробирку и немедленно нейтрализовали добавлением 1/12 объема 1 M Трис. К полученному элюату добавляли 400 мкл суспензии клеток *E. coli* TG1, находящихся в экспоненциальной фазе роста. Смесь инкубировали 1 ч при 37°C, после чего ею инокулировали 200 мл среды 2xYT с 1% глюкозой и 100 мкг/мл ампициллина. Культуру растили в течение ночи при 37°C и интенсивной аэрации. После этого выделяли фагмидные частицы.

Первичный анализ селектированной библиотеки методом иммуноскрининга на чашках Петри. Клетки *E. coli* TG1, инфицированные фагмидными частицами, выделенными после четвертого раунда иммуноселекции, высевали на чашки Петри с агаризованной средой 2xYT, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 0.1% глюкозу, и инкубировали в течение ночи при 30°C. После подсчета числа выросших колоний с чашек снимали реплики на нитроцеллюлозные фильтры. Фильтры перекадывали на поверхность среды 2xYT, содержащей 1 mM IPTG, и инкубировали 2 ч при 30°C. Фильтры-реплики отмывали от клеток *E. coli* 5 раз буфером TBS-T (20 mM Трис-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Твин-20), затем помещали на 30 мин в раствор, содержащий 1% BSA и 5% лошадиной сыворотки в буфере TBS-T. После этого фильтры инкубировали 15 мин при комнатной температуре в растворе биотинилированного G-CSF (20 нг/мл). После пятикратной отмывки буфером TBS-T по 15 мин фильтры инкубировали в TBS-T со стрептавидин-фосфатазным конъюгатом (Amersham, Англия, рабочее разведение 1 : 3000) 30 мин при комнатной температуре. Последующие обработки велись согласно инструкции фирмы-производителя. Колонии, дающие наиболее выраженный сигнал, были отобраны для дальнейшего анализа.

Клонирование последовательности ДНК, кодирующей антигенную детерминанту интерлейкина-2 для антител ЛНКБ-2. Фагмиды, отобранные после первичного анализа, были гидролизованы с помощью *NotI* и лигированы с адаптором, кодирующим антигенную детерминанту интерлейкина-2. Полученной ДНК трансформировали клетки *E. coli* JS5 и отбирали по 10 клонов для дальнейшего анализа. Каждой из 10 колоний инокулировали 1 мл среды 2xYT и растили при 30°C в присутствии 100 мкг/мл ампициллина и 1 mM IPTG в течение 16 ч. Клетки осаждали центрифугиро-

ванием, а супернатант использовали для ИФА с антителами ЛНКБ-2.

Для выделения антител, секретируемых клетками в культуральную среду, отобранными фагмидными частицами инфицировали штамм *E. coli* JS5, который не несет мутации supE. Трансформированные клетки выращивали в 100 мл среды 2xYT в течение ночи при 30°C в присутствии 100 мкг/мл ампициллина и 1 mM IPTG, осаждали центрифугированием, а супернатанты концентрировали 10 раз при помощи концентрирующей ячейки Amicon с использованием мембраны YM 10. Далее проводили иммуноаффинную хроматографию на Sepharose 4B-CL с иммобилизованными антителами к интерлейкину-2. Иммуноаффинный сорбент готовили по стандартной методике, включающей стадию активации сефарозы BrCN [10].

Определение констант аффинности проводили по методу, предложенному в работе [11], с использованием непрямого ИФА. Расчет осуществляли по формуле: $K_a = 1/(2[A_2'] - [A_2])$, где $[A_2]$ – концентрация антигена, соответствующая точке перегиба на кривой титрования при концентрации антител C_0 ; $[A_2']$ – концентрация антигена, соответствующая точке перегиба на кривой титрования при концентрации антител $C_0/2$.

Авторы выражают глубокую благодарность В.Г. Коробко за предоставление рекомбинантного G-CSF. Мы благодарим Р.Л. Комалеву за неоценимую помощь в работе, а также сотрудников и аспирантов лаборатории иммунохимии ИБХ РАН, оказавших поддержку в ходе данного исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке некоммерческого партнерства “АСГЛ – разра-

ботка новых подходов к поиску мишеней в фармакологии” и Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 98-04-48705.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McCafferty J., Griffiths A.D., Winter G., Chiswell D.J. // Nature. 1990. V. 348. P. 552–554.
2. Hoogenboom H.R., Griffiths A.D., Johnson S., Chiswell D.J., Hudson P., Winter G. // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. P. 4133–4137.
3. Clark C.C., Kamen R. // Science. 1987. V. 236. P. 1229–1236.
4. Knapik A., Ge L., Honegger A., Pack P., Fischer M., Wellenhofer D.G., Wolle J., Pluckthun A., Virnekas B. // J. Mol. Biol. 2000. V. 296. P. 57–86.
5. Clackson T., Hoogenboom H.R., Griffiths A.D., Winter G. // Nature. 1991. V. 352. P. 624–628.
6. Orlandi R., Güssow D.H., Jones P.T., Winter G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 3833–3837.
7. Ward E.S., Güssow D.H., Griffiths A.D., Jones P.T., Winter G. // Nature. 1989. V. 341. P. 544–546.
8. Hong Zhou, Fisher R.J., Papas T.S. // Nucl. Acids Res. 1994. V. 22. P. 888–889.
9. Lunev V.E., Lukin Yu.V., Kazennykh N.V., Belyaev S.V., Zubov V.P., Nesmeyanov V.A. // Biomed. Sci. 1990. V. 1. P. 68–72.
10. Клаус Г.Г.Б. Лимфоциты: Методы. М.: Мир, 1990.
11. Маннатис Т., Фритч И., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
12. Дин П., Джонсон У., Мидл Ф. Аффинная хроматография. Методы. М.: Мир, 1988.
13. Beaty J.D., Beaty B.G., Vlahos W.G. // J. Immunol. Meth. 1987. V. 100. P. 173–179.

The Production of Miniantibodies Against Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor Using the Murine scFv Combinatory Library

A. G. Laman^{*#}, A. O. Shepelyakovskaya^{*}, A. B. Ulitin^{*}, E. V. Markova^{***},
T. Yu. Mareeva^{**}, N. S. Bystrov^{**}, F. A. Brovko^{*}, and V. A. Nesmeyanov^{**}

[#]Phonelfax: +7 (095) 330-5974; e-mail: vnes@ibch.ru

^{*}Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry (Pushchino Branch),
Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 6, Pushchino, 142290 Russia

^{**}Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

^{***}Krasnoyarsk State University, Russia

To develop a phage display of single-chain antibodies (scFv), fractions of total cell DNA and RNA were obtained from splenocytes of naive mice. The DNA fragments encoding variable regions of light and heavy immunoglobulin chains were amplified and isolated using primers specific to the conservative regions of these genes. The construction of the library was based on the principle of stochastic combining of the DNA fragments encoding the light and heavy antibody chains with the DNA linker, whose structure corresponded to the (Gly₄Ser)₃ sequence. The scFv library was constructed using the *E. coli* TG1 strain and the phagemid vector pHEN1. The repertoire of the library exceeded 5×10^7 independent recombinant clones. The clones producing antibodies to the granulocyte colony-stimulating human factor were isolated. The affinity constants of the resulting scFv were in the range of 2×10^4 to 1.8×10^7 M⁻¹. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: affinity selection, antibody phage display library, granulocyte colony-stimulating factor, murine single-chain Fv, phage display library