

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ И СПОСОБЫ УВЕЛИЧЕНИЯ ИХ АФФИННОСТИ

©2010 г. Е. П. АЛЬТШУЛЕР, Д. В. СЕРЕБРЯНАЯ,
А. Г. КАТРУХА

*Кафедра биохимии биологического факультета Московского
государственного университета им. М.В.Ломоносова, Москва.*

I. Введение. II. Антитела: строение, функции, аффинное созревание в организме, практическое применение. III. Рекомбинантные антитела: производные и фрагменты, методы получения, практическое значение. IV. Увеличение аффинности антител. V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Открытие метода получения моноклональных антител с использованием гибридомной технологии Келлером и Мильштейном в 1975 г. оказало огромное влияние на развитие фундаментальной науки и клинической практики. Благодаря уникальному свойству специфично и с высоким сродством взаимодействовать с антигенами, моноклональные антитела начали активно использовать для научных исследований и терапии различных заболеваний. На сегодняшний день, антитела составляют приблизительно одну треть от общего

Принятые сокращения: Ig – иммуноглобулины; IgG – иммуноглобулины класса G; LC – легкая цепь иммуноглобулинов (light chain); HC – тяжелая цепь иммуноглобулинов (heavy chain); V_H – переменный домен тяжелой цепи (variable domain of the heavy chain); V_L – переменный домен легкой цепи (variable domain of the light chain); Fv – переменный участок (variable fragment); FR – каркасные участки молекулы антитела (framework regions); CDR – участки молекулы антитела, распознающие антиген (complementarity determining regions); SDR – аминокислотные остатки CDR, определяющие специфичность взаимодействия с антигеном (specificity determining regions); C_H – константный домен тяжелой цепи (constant domain of the heavy chain); C_L – константный домен легкой цепи (constant domain of the light chain); Fab-фрагмент – антиген-связывающий фрагмент антитела (fragment, antigen-binding); Fc – кристаллизуемый фрагмент антитела (fragment, crystallizable); а.о. – аминокислотный остаток; м.м. – молекулярная масса.

Адрес для корреспонденции: DariaSerebryanaya@gmail.com

количества белков, используемых в терапии различных заболеваний в развитых странах [1].

В течение последних 15 лет развитие технологий получения рекомбинантной (искусственно созданной) ДНК и создание комбинаторных библиотек генов, а также появление разнообразных биоинформатических ресурсов и методов компьютерного моделирования трехмерных структур белковых молекул сделало возможным получение рекомбинантных антител. Рекомбинантные технологии позволяют путем искусственного внедрения в последовательность антител разнообразных модификаций изменять их биохимические и иммунохимические свойства [2], в том числе и изменять (увеличивать) аффинность антител. Несомненным достоинством рекомбинантных технологий является то, что с их помощью можно не только получать рекомбинантные аналоги уже существующих антител, но и создавать антитела, специфичные к различным антигенам, *de novo*.

В настоящее время опубликовано много обзорных статей, посвященных различным методам создания рекомбинантных антител [2–9]. Однако, как нам кажется, в этих публикациях не уделяется достаточно внимания проблеме и методологии искусственного повышения аффинности рекомбинантных антител. Данный обзор включает в себя две основные части. В первой подробно рассмотрены строение, способы получения и практическое применение рекомбинантных антител и их фрагментов. Во второй систематизированы основные подходы, используемые для получения высокоаффинных рекомбинантных антител, — от методов случайного и направленного мутагенеза до технологии рекомбинации генов антител. Особое внимание авторы уделили методам компьютерного моделирования, позволяющим предсказывать трехмерную структуру антител и идентифицировать аминокислоты, которые вносят наибольший вклад во взаимодействие молекул антитела и антигена и могут быть заменены другими а.о. для создания антител с увеличенным аффинитетом.

II. АНТИТЕЛА: СТРОЕНИЕ, ФУНКЦИИ, АФФИННОЕ СОЗРЕВАНИЕ В ОРГАНИЗМЕ, ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Антитела (иммуноглобулины) — это семейство гликопротеинов, представленных в плазме крови и тканевых жидкостях позвоночных, способных распознавать и связывать чужеродные для организма вещества (антигены). Участок антигена, с которым взаимодействует антитело, называется эпитопом, а участок антитела, за счет которого

оно взаимодействует с антигеном, – паратопом [10]. В данной главе рассматриваются особенности строения антител на примере иммуноглобулинов класса G, их основные функции, процесс их аффинного созревания в организме, а также, некоторые аспекты применения антител в научных исследованиях, диагностике и терапии различных заболеваний.

СТРОЕНИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

У большинства млекопитающих обнаружены 5 различных классов иммуноглобулинов (Ig): IgG, IgA, IgM, IgD и IgE. Антитела разных классов различаются по размеру, заряду белковой молекулы, аминокислотному составу и содержанию углеводного компонента. IgG в норме преобладают в сыворотке крови человека и составляют приблизительно 70–75% от общего количества сывороточных антител [10–12]. Молекула антитела класса IgG построена из четырех полипептидных цепей: двух одинаковых тяжелых цепей (heavy chain, HC) с молекулярной массой 50–77 кДа и двух идентичных легких (light chain, LC) с м.м. 25 кДа (рис. 1). В состав каждой LC входит два домена – один переменный (V_L , *variable domain of the light chain*) и один константный (C_L1 , *constant domain of the light chain*), а в состав каждой HC – один переменный (V_H , *variable domain of the heavy chain*) и три константных (C_H1-3 , *constant domains of the heavy chain*) домена. Каждый из доменов в основном представляет собой β -складчатую структуру, сформированную из 7 антипараллельных β -сладков, образующих два β -листа. Структура каждого иммуноглобулинового домена стабилизирована за счет внутридоменной дисульфидной связи. Кроме того, дисульфидные связи соединяют легкие цепи с тяжелыми, а также тяжелые цепи между собой. Каждая пара переменных доменов V_H и V_L , расположенных в соседних тяжелой и легкой цепях, образует переменный фрагмент (Fv, *variable fragment*). Уровень вариабельности а.о. внутри переменных доменов распределен неравномерно. Он наиболее высок в коротких, так называемых «гипервариабельных» областях – CDR (*complementarity determining regions*), определяющих комплементарность антитела антигену. В переменных доменах тяжелой и легкой цепей выделяют по три CDR (V_L CDR1–3, V_H CDR1–3). В последовательности переменного домена эти области чередуются с четырьмя относительно инвариантными «каркасными» участками (FR – *framework region*, FR1–FR4), на долю которых приходится около 80% аминокислотной последовательности V-доменов. Роль таких участков заключается в поддержании относительно однотипной трехмерной структуры V-доменов, которая

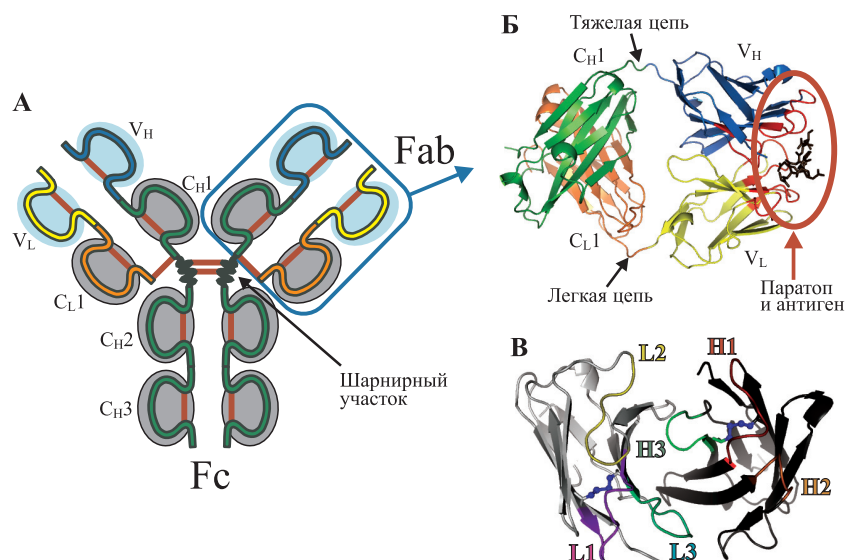


Рис. 1. Строение молекулы иммуноглобулина класса G.

А) Общая схема. Молекула IgG состоит из двух легких цепей (LC) и двух тяжелых цепей (HC). Каждая LC состоит из переменного (V_L) и константного домена (C_{L1}), а каждая HC состоит из одного переменного (V_H) и трех константных доменов (C_{H1-3}). В структуре Ig выделяют два фрагмента: антиген-связывающий Fab-фрагмент и Fc-фрагмент, выполняющий эффекторную функцию. Структура Ig стабилизирована благодаря наличию дисульфидных связей (отмечены красными линиями), соединяющих LC и HC, а также HC между собой. Также дисульфидные связи имеются внутри каждого из доменов.

Б) Взаимодействие антигена и Fab-фрагмента антитела (трехмерная структура Fab-фрагмента 1CFN из базы данных PDB).

В состав Fab-фрагмента входит LC и N-концевой участок HC, включающий домены V_H и C_{H1} . Каждый Fab-фрагмент содержит участок связывания антигена (паратоп), расположенный в области переменных доменов легкой и тяжелой цепей. CDR-петли отмечены на рисунке красным цветом.

В) Строение антиген-связывающего участка (трехмерная структура Fab-фрагмента 1CFN из базы данных PDB).

Антигенсвязывающий участок каждого Fab-фрагмента состоит из а.о., входящих в состав шести гипервариабельных петель (CDR-петель), расположенных на поверхности переменных доменов LC и HC. На рисунке гипервариабельные петли отмечены цветом (L1–3 – CDR-петли, входящие в состав LC в порядке их расположения в последовательности, H1–3 – CDR-петли, входящие в состав HC).

необходима для обеспечения аффинного взаимодействия гипервариабельных участков с антигеном [10, 12].

Вариабельные домены легкой и тяжелой цепи (V_H и V_L) вместе с ближайшими к ним константными доменами (C_H1 и C_L1) образуют Fab-фрагменты антител (fragment, antigen binding). Остальную часть, представленную С-концевыми константными доменами тяжелых цепей, обозначают как Fc-фрагмент (fragment, crystallizable). На границе Fab и Fc фрагментов располагается «шарнирная область», которая за счет своей гибкой структуры обуславливает подвижность фрагментов молекулы антитела относительно друг друга и содержит дисульфидные связи, соединяющие тяжелые цепи между собой [10, 12].

Как уже упоминалось выше, ключевую роль во взаимодействии антигена и антитела выполняют CDR. Эти гипервариабельные участки представляют собой петли, расположенные между β -складками, сильно отличающиеся по аминокислотной последовательности и протяженности у различных антител. CDR обеспечивают комплементарность поверхностей паратопа и эпитопа, что обуславливает антиген-узнающую активность апикальных регионов вариабельных доменов. Основой взаимодействия антитела и антигена является распознавание трехмерной структуры, формируемой из шести петель CDR, комплементарного ей эпитопа на поверхности антигена. В случае антител, специфичных к небольшим антигенам (таким, как низкомолекулярные соединения) во взаимодействии с антигеном участвуют только некоторые из CDR [13]. Как правило, V_H CDR (и особенно V_H CDR3) вносят больший вклад в образование контактов с антигеном, чем V_L CDR, и геометрический центр контакта антигена и антитела обычно расположен вблизи от V_H CDR3 [13]. А.о. CDR, непосредственно участвующие в контакте с антигеном, называют участками, определяющими специфичность (specificity determining regions, SDR). Анализируя трехмерную структуру комплекса антитела и антигена можно идентифицировать а.о., находящиеся в прямом контакте с антигеном. Считается, что FR также могут принимать участие в распознавании антигена, но в меньшей степени (доля поверхности таких участков от контактирующих поверхностей антигена и антитела может составлять до 15%) [13–15].

Для комплексов антитело-антиген характерна высокая комплементарность структур взаимодействующих поверхностей. Площадь поверхности взаимодействия антигена белковой природы и антитела варьирует от 1400 до 2300 Å² с приблизительно равным вкладом со стороны антитела (650–900 Å²) и антигена [16]. Во взаимодействие с антителом вовлечено, как правило, от 5 до 15 а.о. антигена белко-

вой природы и приблизительно столько же а.о. молекулы антитела [16–17]. Однако антигены меньшего размера, такие, как низкомолекулярные соединения, имеют меньшую площадь контакта при связывании с антителом. Форма контактирующей поверхности антигена с антителом в значительной степени зависит от размера антигена. С уменьшением размера антигена контактирующая поверхность антитела становится более вогнутой. Контактующая поверхность антител, связывающих белковые молекулы, как правило, плоская, тогда как поверхность связывания более мелких антигенов представляет собой бороздку (в случае пептидов) или одиночную полость (в случае низкомолекулярных веществ непептидной природы) [13, 18]. Пространственная структура антигенсвязывающего участка определяется протяженностью и аминокислотным составом CDR-петель. Для петель CDR3 характерна значительная гибкость, которая определяет возможность взаимной адаптации эпитопа и паратопа. Для антигенов небольшого размера, в том числе пептидов, конформационная гибкость антител может быть более выраженной, чем для антигенов белковой природы. К основным типам конформационной подвижности относят согласованные перемещения нескольких CDR-петель и изменения положения боковых групп отдельных а.о. CDR. Для антигенов также характерно изменение конформации при взаимодействии с антителами.

Взаимодействие между а.о. эпитопа и паратопа осуществляется преимущественно благодаря водородным связям, ионным взаимодействиям и, в меньшей степени, Ван-дер-Ваальсовым взаимодействиям [13, 19]. В нескольких работах показано, что в структурах многих комплексов антигенов белковой природы и антител в области паратопа присутствуют молекулы воды, входящие в общую структуру. Предполагается, что в таких комплексах молекулы воды необходимы для «заполнения» дефектов комплементарности между белковой молекулой и антителом [18, 20–21].

В основном, энергия связывания антитела и антигена обусловлена небольшим количеством взаимодействий между а.о. эпитопа и паратопа. Замена таких а.о. в природных вариантах антигена или антител на аланин часто приводит к резкому ослаблению связывания антитела и антигена (см. далее). Выбор именно аланина в качестве возможной замены можно объяснить тем, что это – наиболее мягкий способ устранения взаимодействий, обусловленных боковой группой аминокислоты, при этом не вносящий дополнительных взаимодействий. В результате экспериментов по картированию эпитопа и паратопа были выявлены так называемые «горячие

точки» — а.о., вклад которых во взаимодействие антигена и антитела наиболее велик. Такие а.о. часто располагаются в центральной части участка взаимодействия эпитопа и паратопа. Периферические а.о., контактирующие с водной средой, как правило, вносят значительно меньший вклад в энергию связывания антитела с антигеном [16]. Кроме а.о., непосредственно вовлеченных во взаимодействие с антигеном, важную роль в распознавании антигена играют а.о., выполняющие структурную функцию и обеспечивающие правильное взаимное расположение в пространстве контактирующих поверхностей. Эти остатки поддерживают необходимую для взаимодействия с антигеном конформацию CDR-петель [22].

ФУНКЦИИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Антитела синтезируются В-лимфоцитами в ответ на появление антигенов в организме позвоночных или человека. В работе иммунной системы антитела участвуют в нескольких процессах: 1) предотвращение попадания чужеродных (в том числе и патогенных) молекул в клетки и их разрушение за счет образования комплексов с антителами, 2) стимуляция уничтожения чужеродных объектов макрофагами и другими клетками путем взаимодействия антител с их поверхностными антигенами (опсонизация), 3) запуск механизмов разрушения чужеродных частиц за счет стимуляции иммунного ответа (активация системы комплемента).

Антитела всех изотипов выполняют две основные функции: 1) распознавание и связывание антигена, 2) эффекторные функции, к которым относят связывание с мембранными рецепторами клеток организма (например, фагоцитов) и взаимодействие с первым компонентом системы комплемента для инициации классического пути каскада комплемента. Для эффективного выполнения функции узнавания и связывания антитела должны иметь высокую специфичность, чтобы распознавать только конкретный антиген, и высокую аффинность, чтобы комплекс антитела и антигена был стабильным. В реализации первой функции принимают участие переменные домены антитела. Задачей константных доменов является поддержание необходимой структуры антигенсвязывающих переменных доменов, а также выполнение эффекторных функций, способствующих нейтрализации и устранению потенциальных патогенов. Для нейтрализации некоторых вирусов и токсинов достаточно только взаимодействия с антителом, тогда как для устранения патогенных микроорганизмов или собственных клеток, вышедших из-под контроля организма, требуется запуск других эффекторных механизмов, таких как фагоцитоз

и цитотоксические реакции. В этом случае Fab-фрагменты антител связываются с антигенами, расположенными на поверхности клеток, а Fc-фрагменты таких антител могут взаимодействовать с белками системы комплемента, служащими для уничтожения клеток путем перфорации мембраны, либо с Fc-клеточными рецепторами, локализованными на поверхности клеток иммунной системы, способных к фагоцитозу [23]. Таким образом, благодаря наличию в молекуле антитела и Fc фрагмента и Fab фрагментов, антитела способны и распознавать антиген, и активировать систему уничтожения чужеродных веществ и некоторых собственных клеток.

Для успешного выполнения функции узнавания и связывания каждого конкретного антигена антитела должны пройти процесс аффинного созревания.

АФФИННОЕ СОЗРЕВАНИЕ АНТИТЕЛ В ОРГАНИЗМЕ

Благодаря огромному разнообразию центров связывания антитела обеспечивают распознавание миллионов различных антигенов. Информация о различных вариантах последовательности антител не закодирована в геноме заранее, а создается в В-лимфоцитах путем рекомбинации ограниченного количества генных сегментов. В геномах человека и мыши имеются семейства генов иммуноглобулинов класса G, сгруппированные в три независимых генетических локуса: два, кодирующие легкие цепи IgG, и один, кодирующий тяжелую цепь IgG. Каждое из этих семейств включает множество генов, кодирующих переменные домены, и единичные гены, кодирующие константные домены. Эти группы генов находятся на значительном расстоянии друг от друга. На первом этапе, образование LC и HC происходит в результате рекомбинации генов, кодирующих один переменный и один константный участок IgG. Между V- и C-генами находятся последовательности D и J, кодирующие небольшие фрагменты полипептидной цепи, входящие в состав переменной области. В ходе созревания В-лимфоцитов происходит рекомбинация V, D и J генов, в результате которой участки последовательности, кодирующие переменные и константные домены, а также промоторы, находящиеся перед каждым геном, и энхансеры, находящиеся в интроне между J- и C-сегментами и в дистальной области за C-генами, сближаются. Таким образом, в результате рекомбинации образуется транскрипционная единица, содержащая интроны и экзоны. В результате сплайсинга из первичного РНК-транскрипта вырезаются интроны, а экзоны образуют молекулу мРНК, с которой впоследствии транслируется белок [24]. Таким образом создается

молекулярное разнообразие центра узнавания, локализованного на непрерывной поверхности, формируемой CDR-петлями. Полученные в результате этого процесса антитела называются первичными (germ-line antibodies) и обладают относительно низкой аффинностью, а также не очень высокой специфичностью по отношению к их антигенам [13, 25].

На следующем этапе созревания антител и аффинность, и специфичность первичных антител увеличивается. Это происходит в результате соматической гипермутации переменных участков антител. Соматическая гипермутация – это циклы генерации множества вариантов антител, возникающих за счет появления случайных точечных мутаций в генных сегментах, сопровождаемые отбором наиболее удачных клонов. Отбор клонов в иммунной системе при соматической гипермутации происходит следующим образом. Мембранная форма иммуноглобулинов, иммобилизованная на поверхности В-клеток, взаимодействует со своим антигеном. Полученный комплекс антигено-антитело подвергается интернализации, после чего антиген подвергается процессингу и производные от антигена пептиды взаимодействуют с главным комплексом гистосовместимости II (major histocompatibility complex II) и презентуются Т-клетками. Затем происходит презентация антигена Т-клетками, сопровождающаяся активацией В-клеток. Если аффинность антител, расположенных на поверхности В-клетки, недостаточно высока, то за время, необходимое для интернализации, антиген успевает диссоциировать от антитела и в этом случае активации данной В-клетки не происходит. Если же время жизни комплекса антигено-антитело значительно превышает время, необходимое для интернализации, то происходит активация В-лимфоцита. Однако при этом оказывается, что иммунная система не способна осуществлять дальнейший отбор наиболее аффинных среди нескольких вариантов высокоаффинных антител. Мутации происходят как в CDR-петлях, так и в FR-участках, причем неравномерно, со средней частотой 1 на 10^3 пар оснований за один цикл генерации. В результате, происходит увеличение разнообразия иммуноглобулинов, созданного рекомбинацией генных сегментов. Полученные антитела называют «зрелыми» (mature antibodies) [25–26].

Как показали исследования механизмов соматической гипермутации, при созревании антител мутации в переменных доменах возникают большей частью в определенных участках CDR и FR. Эти участки называют «горячими точками мутагенеза» («hot spots»), а участки, редко вовлекаемые в процесс мутагенеза, называют «холодными точками мутагенеза» («cold spots»). Обычно а.о., входящие в

состав «холодных точек мутагенеза», совпадают с а.о., играющими важную роль в формировании конформации переменного домена. Известно, что горячие точки в 50–60% случаев располагаются внутри консенсусной последовательности нуклеотидов RGYW (R = А или G, Y = С или Т, W = А или Т) и сериновых кодонов AGC и AGT или в соседних с ними нуклеотидах [27–28]. Среди других тринуклеотидов, а также динуклеотидов, существует иерархия подверженности мутагенезу, причем мутации в V-генах происходят в миллионы раз чаще, чем спонтанные мутации в других генах. В CDR- и FR-участках наблюдаются различия в составе кодонов, причем в CDR встречаются кодоны, в которых наиболее часто происходят мутации [25]. В первичной популяции антител различия в аминокислотной последовательности сосредоточены в основном в центре антигенсвязывающего сайта, а за счет соматической гипермутации различия также распространяются на периферическую часть антигенсвязывающего участка [29].

При вторичном иммунном ответе для антител класса IgG, специфичных к белковым антигенам, характерны значения константы диссоциации (K_D) в диапазоне 10^{-7} – 10^{-10} М⁻¹. Максимально возможная скорость образования комплекса антитела с антигеном определяется скоростью диффузии белковых молекул. Константа скорости ассоциации (k_a) в этом случае составляет порядка 10^6 М⁻¹с⁻¹. Константа скорости диссоциации комплекса (k_d) может достигать до 10^{-4} с⁻¹ и ее величина определяется за счет отбора вариантов первичных антител *in vivo* [8, 30]. Т.к. согласно гипотезе о максимальном значении аффинности («affinity ceiling») [30–32], отбор антител с более высокой аффинностью происходит уже менее эффективно, а дальнейшее увеличение аффинности уже не приводит к увеличению эффективности отбора. Это связано с тем, что для антител с $K_D = 10^{-10}$ М⁻¹ время полужизни комплекса антигена с В-клеточным рецептором составляет 30 мин. Это в 2–3 раза больше, чем время эндоцитоза комплекса антитела с В-клеточным рецептором (около 8.5 мин.). В результате, дальнейшее увеличение аффинности (времени полужизни комплекса) уже не способствует адаптивному увеличению пролиферации В-клеток [31, 33]. Поэтому, теоретически, искусственный мутагенез, схожий с соматической гипермутацией, и искусственный отбор наиболее аффинных вариантов антител могут приводить к созданию антител с более высокой аффинностью по сравнению с природными антителами.

Для первичных антител процесс ассоциации с антигеном сопровождается увеличением энтальпии (за счет многочисленных слабых

и сильных взаимодействий между антителом и антигеном), и в то же время уменьшением энтропии (потеря подвижности, которая имеет место в структуре свободного антитела). В случае диссоциации наблюдается обратная ситуация (энтальпия системы снижается, а энтропия возрастает). Относительное увеличение аффинности конечных вариантов антител происходит за счет устранения энтропийных затруднений путем уменьшения подвижности свободного состояния антитела [13]. Первичные антитела, как правило, обладают большей гибкостью и подвижностью антигенсвязывающих петель. Это позволяет им узнавать набор из сходных антигенов посредством формирования различных вариантов комплементарных поверхностей за счет гибкой структуры петель. Взаимодействие первичных антител с антигеном может быть описано моделью «индуцированного взаимодействия», когда строение эпитопа в процессе связывания влияет на формирование комплементарного паратопа. Однако в процессе созревания антител, сопровождающимся увеличением их аффинности и специфичности, гибкость антигенсвязывающих петель снижается и процесс взаимодействия антитела с антигеном становится все более идентичным модели «ключ-замок». При этом участок связывания антигена после его созревания теряет подвижность и остается в конформации, которая лучшим образом соответствует конкретному эпитопу. Таким образом благодаря уменьшению подвижности петель антигенсвязывающего участка происходит увеличение аффинности и специфичности антитела [34]. С другой стороны для некоторых антител увеличение конформационной подвижности позволяет увеличить пространственное соответствие паратопа эпитопу путем индуцированного взаимодействия. Этот эффект позволяет объяснить увеличение аффинности некоторых антител при внедрении глицина в последовательности CDR, который увеличивает конформационную подвижность без существенного изменения поверхности взаимодействия с антигеном [35–37].

У большинства белков основную часть сохраняющихся аминокислотных замен составляют консервативные мутации, т.е. замены на аминокислоты со сходными физико-химическими свойствами, что имеет меньше шансов нарушить конформацию белка. Однако это правило не всегда справедливо для переменных доменов антител, поскольку замены на а.о. с противоположными свойствами иногда приводят к увеличению аффинности антител. Как правило, это относится к мутациям в CDR-участках, но иногда и к FR-мутациям, поскольку FR-остатки играют важную роль в формировании и поддержании стабильности структуры белка, что также может

оказывать влияние на аффинность. В целом, для FR-участков более характерно возникновение консервативных мутаций, а для CDR – неконсервативных мутаций, сопровождающихся существенными изменениями физико-химических свойств. При этом для а.о., расположенных внутри молекулы, более характерны консервативные мутации, чем для а.о., доступных растворителю. Как правило, доступные растворителю а.о. CDR в ходе созревания антител подвергаются замене на гидрофильные, полярные и поляризуемые а.о. для увеличения их потенциала взаимодействия с антигеном. Хотя теоретически для каждой аминокислотной позиции существует 19 вариантов замены, круг наблюдаемых мутаций значительно сужен за счет энергетических препятствий, вырожденности генетического кода и того, что большинство аминокислотных замен являются следствием замены одного нуклеотида. Кроме того, транзиции (замены пуринового основания на пуриновое или пиримидинового на пиримидиновое) преобладают над трансверсиями (замены пуринового основания на пиримидиновое или пиримидинового на пуриновое). Как правило, транзиции происходят в два раза чаще, чем трансверсии, поэтому число возможных вариантов замен в каждой позиции понижается до 13–15 [5, 25, 38].

Аффинность зрелых антител определяется мутациями, привнесенными в последовательность первичных антител. Как правило, антитела, имеющие в составе паратопа большее количество остатков, способных к образованию водородных связей и ионных взаимодействий, демонстрируют большее сродство к антигену [25]. К увеличению аффинности могут также приводить мутации, способствующие образованию связей антитела и антигена через молекулы воды («водные мостики») [13]. При этом наблюдается усиление гидрофобных и Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий на периферии за счет увеличения площади гидрофобной поверхности. Подобное усиление гидрофобных взаимодействий является следствием небольших скоординированных перестроек а.о. на периферии контактирующей поверхности, тогда как наиболее важный с энергетической точки зрения центр взаимодействия остается неизменным. Соматическая гипермутация приводит не только к увеличению аффинности путем замен в участке связывания антигена, но также к увеличению силы взаимодействия между V_L – V_H доменами, тем самым увеличивая стабильность и уменьшая пластичность молекулы антитела. В то же время, эти изменения приводят к улучшению связывания антитела с антигеном [37, 39–41]. Количество соматических мутаций, возникающих в процессе созревания антител, положительно коррелирует со степенью увеличения аффинности [13, 32, 42]. Можно сказать, что

замены, возникающие в ходе соматической гипермутации с одной стороны увеличивают химическую активность остатков CDR, а с другой – поддерживают их структуру.

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ АНТИТЕЛ

Антитела широко используются как в научных исследованиях, так и в практической медицине благодаря их способности с высокой аффинностью и специфичностью узнавать практически любой антиген.

Самый простой способ получения антител, специфичных к какому-либо антигену, это иммунизация – введение антигена в смеси с определенными добавками – адъювантами, усиливающими иммунный ответ, в организм животного (мышь, кролик, коза, овца, и др.). Из крови иммунизированного животного можно выделить поликлональные антитела – гетерогенную по строению, эпитопной специфичности и аффинности популяцию антител, специфичных к введенному антигену. Чтобы получить идентичные по своей структуре и специфичности антитела, необходимо выделить из организма животного продуцирующие антитела лимфоциты, и immortalizировать их, т.е. сделать способными к бесконечному количеству делений. Immortalization осуществляется путем слияния лимфоцитов с опухолевыми клетками. Линия клеток, представляющих собой продукт слияния лимфоцита и опухолевой клетки, называется гибридомой. Гибридома способна секретировать антитела, абсолютно одинаковые по своим свойствам (строение, аффинитет, специфичность). Антитела, продуцируемые линией гибридомных клеток, называются моноклональными [43].

Антитела являются одним из наиболее распространенных инструментов современной биохимии, цитологии и клинической химии. С их помощью можно проводить качественное и количественное определение содержания различных веществ методами иммуноферментного анализа [44–45] и иммуноблоттинга [46], изучать внутриклеточную и внеклеточную локализацию белков, исследовать распределение и уровень экспрессии белков в различных клетках организма методами иммуногистохимии и иммуноцитохимии. Антитела также могут быть использованы для сортировки клеток методом проточной цитометрии, а также для очистки различных белков.

В медицине антитела широко используют как в диагностических целях, так и для терапии различных заболеваний. В диагностике различные иммунохимические методы используются для установления наличия или определения концентрации белков, являющихся маркерами заболеваний. Список таких белков огромен и продолжает расти. К ним относятся белки-маркеры сердечно-сосудистых заболеваний

(тропонины I и Т [47–51], креатинкиназа [52], миоглобин [53], натрийуретический пептид В и его предшественник [54–56] и др.), сахарного диабета (гликированный гемоглобин [57], микроальбумин, инсулин, проинсулин, С-пептид [58] и др.), раковых заболеваний [59], патологий при беременности, почечной недостаточности (цистатин С [60]), аутоиммунных заболеваний (антитела к компонентам собственных клеток организма [61]), аллергических состояний (общее содержание антител, содержание антител к определенным аллергенам), расстройств эндокринной системы (гормоны, их предшественники, продукты их метаболизма и взаимодействующие с ними белки [62–63]), инфекционных заболеваний различной природы [64–67] и др.

Кроме этого, антитела используют для определения группы крови [68], диагностики беременности [69] и измерения содержания лекарств или токсинов в крови человека, а также в продуктах питания.

Терапевтическое применение полноразмерных антител, получаемых из сыворотки иммунных животных или с использованием гибридомных технологий, существенно осложняется тем, что константные домены антител животных являются сильно иммуногенными для человека, что приводит к образованию собственных антител, специфичных к антителам животного [6]. Поэтому для терапевтических целей, как правило, используют рекомбинантные антитела или их фрагменты, полученные из моноклональных, с существенно сниженной за счет генно-инженерных манипуляций иммуногенностью, либо полученные *de novo* с использованием различных дисплейных методов (см. раздел «Практическое применение рекомбинантных антител в клинической практике и научных исследованиях»).

III. РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНТИТЕЛА: ПРОИЗВОДНЫЕ И ФРАГМЕНТЫ, МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ, ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Рекомбинантными антителами называют антитела, получаемые с использованием подходов генной инженерии. Использование генно-инженерных методов позволяет экспрессировать легкие и тяжелые цепи иммуноглобулинов, как индивидуальные белки, создавать целый набор разнообразных фрагментов антител, а также изменять такие свойства антител, как аффинность, число и специфичность паратопов, состав доменов, подвижность молекулы, пространственную ориентацию участков связывания с антигеном, молекулярный вес, изоэлектрическую точку и потенциальную иммуногенность.

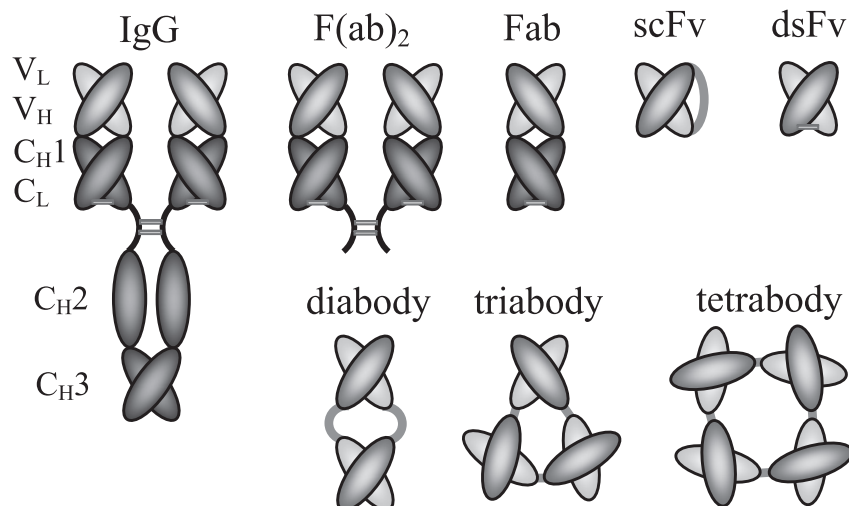


Рис. 2. Основные типы фрагментов и производных рекомбинантных производных антител.

Обозначения: V_L – переменный участок LC; V_H – переменный участок HC; C_L – константный участок легкой цепи; C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} – константные участки тяжелой цепи; IgG – полноразмерный иммуноглобулин класса G. Светло-серыми линиями с окантовкой изображены дисульфидные связи между разными цепями, а темно-серыми – линкерные последовательности, вставляемые для стабилизации структуры рекомбинантных антител (по материалам статей [74–75]).

ТИПЫ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФРАГМЕНТОВ АНТИТЕЛ

В литературе описано получение нескольких различных типов рекомбинантных фрагментов антител (некоторые из них представлены на рис. 2). На сегодняшний день выделяют следующие типы рекомбинантных антител: Fv – переменный фрагмент антитела (*variable fragment*), scFv (single chain Fv) – переменный фрагмент антитела, у которого фрагменты легкой и тяжелой цепи связаны полипептидным линкером, (scFv)₂ – фрагмент, состоящий из двух молекул scFv, соединенных дисульфидной связью, dsFv – переменный фрагмент, стабилизированный дополнительной внутримолекулярной дисульфидной связью, Fab- и (Fab)₂ фрагменты (идентичные по своей структуре фрагментам, образующимся в результате протеолиза полноразмерных антител IgG типа под действием папаина и пепсина, соответственно [70]), V_H – переменный домен HC. Также следует упомянуть такие производные антител как «diabodies», «triabodies»,

«tetraabodies» – молекулы, состоящие из двух, трех или четырех одинаковых или различных фрагментов антител одинаковой или разной специфичности, соединенных между собой. Наименьшим фрагментом антитела, который может сохранять способность связывать антиген, является Fv фрагмент. Он состоит из переменных фрагментов легкой (V_L) и тяжелой цепей (V_H), каждый из которых стабилизирован внутримолекулярной дисульфидной связью. Однако между собой V_H и V_L контактируют только за счет ионных взаимодействий, что делает структуру этого фрагмента крайне нестабильной. Для повышения стабильности структуры Fv фрагментов используют либо введение межцепочечных дисульфидных связей (dsFv), либо – аминокислотной последовательности-линкера между переменными доменами HC и LC цепей (scFv), в результате чего антигенсвязывающая белковая молекула экспрессируется как одна полипептидная цепь [71–73].

Наиболее «простым» объектом для клонирования и экспрессии являются scFv фрагменты, однако часто они обладают более низкой стабильностью, иногда более низкой аффинностью и имеют более короткое время полужизни в кровотоке (при терапевтическом использовании) по сравнению с более крупными фрагментами [37, 74–78]. Комплексы, состоящие из двух («diabodies» или $(scFv)_2$), трех («triabodies») и четырех scFv- мономеров («tetraabodies») часто обладают еще большим сродством к антигену за счет увеличения количества антиген-связывающих участков. Это происходит в случае, когда scFv-мономеры являются производными одинаковых антител, а антиген содержит большое количество идентичных эпитопов, или, в случае когда scFv-мономеры являются производными разных антител к одному антигену, а все эпитопы антигена находятся в доступной для них близости. Фрагменты $(scFv)_2$, полученные в результате соединения дисульфидной связью C-концевых а.о. цистеина, при использовании их в качестве терапевтических агентов лучше транспортируются *in vivo* в ткани по сравнению с scFv –фрагментами. Это связано с большим временем их полужизни в кровотоке и, как следствие, большей стабильностью их структуры по сравнению с scFv. Рекомбинантные производные антител, содержащие Fc-фрагмент, отличаются еще большим временем полужизни. Длительное нахождение таких производных антител в ткани обеспечивается взаимодействием с FcRB рецепторами (Fc Receptor), расположенными на поверхности кровяных клеток и клеток эндотелия. [79–80].

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ И ИХ ФРАГМЕНТОВ

Существует два принципиально разных подхода к получению рекомбинантных антител. Первый заключается в получении рекомбинантных аналогов моноклональных антител или их фрагментов, с использованием генетического материала из гибридомных клеток, продуцирующих моноклональные антитела. Второй подход связан с созданием множества вариантов последовательностей рекомбинантных антител (библиотек) с последующим отбором из них антител требуемой специфичности и аффинности, т.е. созданием антител необходимой специфичности *de novo*.

Создание рекомбинантных аналогов антител

Метод получения рекомбинантных антител или их фрагментов, идентичных антителам, полученным стандартным гибридным методом, включает в себя следующие основные стадии [81–84]: 1) выделение тотальной или матричной РНК из клеток гибридомы, секретирующей антитела, 2) проведение синтеза первичной цепи кДНК (обратная транскрипция), 3) амплификация кДНК тяжелых и легких цепей методом полимеразной цепной реакции [80], 4) получение молекулярно-генетических конструкций, содержащих полученные кДНК, 5) проведение экспрессии (или коэкспрессии) в подходящей экспрессионной системе [85], 6) выделение и очистка экспрессируемого белка [85]. Этот метод позволяет получать как полноразмерные антитела, так и их фрагменты, а также легкую и тяжелую цепи антител, как индивидуальные белки. Использование для получения антител генно-инженерных методов делает возможным манипуляции с нуклеотидной, и, как следствие, с аминокислотной последовательностью легкой и тяжелой цепей.

Создание рекомбинантных антител и их фрагментов de novo

Альтернативным подходом является *in vitro* метод получения рекомбинантных антител или их фрагментов с использованием отбора из библиотек их белковых фрагментов на основе способности связывать антиген [86]. Группа методов, используемых для решения такой задачи, носит название дисплейных. Важным достоинством этой группы методов является возможность работать одновременно с нуклеотидной и аминокислотной последовательностью каждого конкретного варианта антитела. Получение рекомбинантных фрагментов антител, с использованием такого подхода, включает три этапа: создание библиотек рекомбинантных ДНК антител, экспрессия и презентация

белковых фрагментов антител на поверхности клеток или фаговых частиц (в зависимости от того, какой дисплейный метод используют, см. далее) и отбор подходящих белковых фрагментов антител на основе их взаимодействия с антигеном. Если необходимо получить полноразмерное антитело, специфичное к соответствующему антигену, то сначала получают фрагмент антитела, а затем на его основе реконструируют полную нуклеотидную и аминокислотную последовательность антитела.

Принцип дисплея заключается в использовании объединенных в одном молекулярном комплексе нуклеотидной последовательности целевого белка и продукта его экспрессии. Такой метод позволяет отбирать необходимый генетический материал (ДНК или РНК) на основе способности продукта его экспрессии (иммуноглобулина или его фрагмента) к взаимодействию с данным антигеном. С использованием нескольких повторяющихся циклов отбора удастся получить антитела, взаимодействующие с антигеном с высоким сродством. Известны несколько «дисплейных» методов для получения антител – фаговый, рибосомный, мРНК и клеточный дисплей [9, 87–95]. Все эти подходы могут быть использованы не только для создания антител *de novo*, но и для улучшения параметров уже существующих антител (см. раздел «Увеличение аффинности антител»).

Как правило, для создания и тестирования библиотек антител за основу берут не полноразмерные антитела, а их фрагменты. Поскольку scFv фрагменты являются наименьшими стабильными единицами антитела, способными связывать антиген, их намного проще использовать для увеличения аффинности в любом виде дисплея, чем полноразмерные антитела или Fab-фрагменты. Существует несколько принципов создания библиотек рекомбинантных фрагментов антител [77]: 1) на основе генов антител, полученных из иммунизированных доноров (библиотека, обогащенная антителами к определенным антигенам,); 2) на основе генов первичных антител (см. раздел «аффинное созревание антител в организме»), 3) на основе нуклеотидной последовательности антител, полученной из В-лимфоцитов [96], 4) на основе последовательностей наиболее стабильных переменных доменов антител с рандомизированными а.о. в CDR-петлях, синтезированных искусственно. [97].

Для отбора антител с нужными свойствами из огромного количества вариантов (как правило, 10^8 – 10^9), имеющих в библиотеке, используются технологии дисплея. Общей чертой всех этих методов является объединение нуклеотидной и аминокислотной последовательностей отбираемого фрагмента антитела в едином объекте,

а отличаются они типом такого объекта – от комплекса мРНК с синтезированным на ней белком-фрагментом антитела до клетки, несущей фрагмент антитела на своей поверхности. Наиболее распространенным и простым является фаговый дисплей, хотя в последнее время приобретают популярность недавно разработанные методы, такие как клеточный дисплей, рибосомный и мРНК-дисплей.

Клеточный дисплей

Особенностью клеточного дисплея является использование различных прокариотических или эукариотических клеточных систем как для экспрессии различных вариантов антител, так и для осуществления отбора по свойствам экспрессируемых антител. В этом случае создается библиотека гибридных ДНК, одновременно содержащих нуклеотидные последовательности фрагментов антител и трансмембранного домена одного из мембранных белков, а синтезируемые после трансформации (или трансфекции) клеток такой библиотекой антитела представляют собой гибридные белки, состоящие из экспонированного во внеклеточное пространство нативного фрагмента антитела и трансмембранного домена, с помощью которого фрагменты антител заякорены в мембране. Таким образом, клетка выполняет функции связующего звена между экспрессируемым вариантом антитела и кодирующими его генами. Для отбора клонов с наибольшей аффинностью используется вариант метода проточной цитометрии, названный сортировкой флуоресцентно-активированных клеток [90, 95] (fluorescence activated cell sorting, FACS). Этот метод заключается в том, что клетки, содержащие на поверхности фрагменты антител, подвергаются сортировке вместе с антигеном, меченым флуоресцентными красителями, испускающими сигнал при излучении. Различия в интенсивности флуоресценции, излучаемой клетками, помогают дифференцировать аффинные варианты от неаффинных и служат критерием для сортировки материала.

Клеточные дисплеи бывают как прокариотическими, так и эукариотическими. Для прокариотического дисплея характерна высокая эффективность трансформации и простота в использовании, однако область его применения ограничена, поскольку некоторые фрагменты антител, содержащие потенциальные сайты гликозилирования, будучи синтезированными в бактериальной системе, не являются функционально-активными. Для заякоривания синтезированных белковых молекул антител на поверхности бактериальных клеток было предложено использовать несколько трансмембранных белков. Эти трансмембранные белки используются для создания химерных белков, содержащих фрагмент антитела. Так, например, для заякори-

вания scFv-фрагментов антител часто используют белок внешней мембраны OmpA [90–91].

Эукариотический дисплей позволяет проводить экспрессию как различных фрагментов антител, так и полноразмерных вариантов антител, поскольку синтезированная в такой системе белковая молекула имеет необходимые для функционирования посттрансляционные модификации, специфичные для эукариот. Одним из наиболее распространенных видов такого дисплея является дрожжевой, поскольку из всех эукариотических клеток именно дрожжевые клетки наиболее просты для генно-инженерных манипуляций и культивирования. Для экспонирования рекомбинантных фрагментов антител на поверхности дрожжевых клеток предложено создавать гибридные белки, состоящие из антитела или его фрагмента и субъединицы агглютинина Aga2p, которая ковалентно соединена при помощи двух дисульфидных связей с агглютинином Aga1, заякоренным в клеточной стенке дрожжевой клетки [92–95]. Аналогичная стратегия была разработана также и для экспрессии антител в клетках млекопитающих [94].

Фаговый дисплей

При использовании метода фагового дисплея [87] в геном бактериофагов также встраивают ген гибридного белка, представляющего собой продукт объединения фрагмента антитела и поверхностного белка фаговой частицы. Фрагменты Ig оказываются экспонированными на поверхности вирусных частиц (рис. 3). Отбор фаговых частиц производится на основе сродства фрагментов антител к антигену. Как правило, для получения фагового дисплея используется фаг M13 и фрагменты антител экспрессируют в виде гибридных белков с белками оболочки фага pIII, pIV и pVIII [80]. Из отобранных фаговых частиц затем выделяют фаговую кДНК и определяют нуклеотидную последовательность фрагментов антител. На основе этой последовательности в дальнейшем создают полноразмерные рекомбинантные антитела [8–9, 87, 98–99].

Рибосомный дисплей

Другим дисплейным методом является метод рибосомного дисплея [80, 88]. Для рибосомного дисплея используется бесклеточная система синтеза полипептидной цепи с матрицы мРНК. В процессе синтеза белка образуется тройной комплекс белок–рибосома–мРНК (рис. 4). Далее, как и в случае большинства других дисплейных методов, этот комплекс выделяется из раствора на основе сродства синтезированных фрагментов антитела к целевому антигену. Метод позволяет одновременно отбирать наиболее аффинные фрагменты

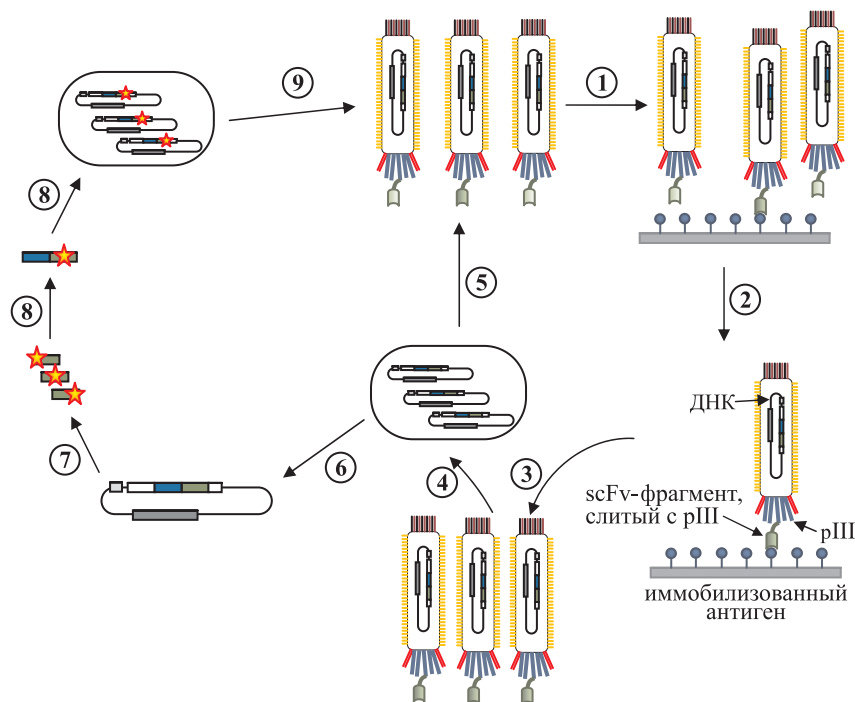


Рис. 3. Увеличение аффинности антител с использованием метода фагового дисплея.

Библиотека из 10^8 – 10^9 вариантов фрагментов антител (как правило, используются scFv-фрагменты антител), экспонированных на поверхности частиц фага M13, инкубируется с иммобилизованным антигеном (1). За несколько этапов промывания удаляют низкоаффинные фаговые частицы (2), затем элюируют оставшиеся связанными фаговые частицы (3). Отобранные после первого цикла частицы амплифицируют путем инфицирования клеток *E. coli* (4) для генерации библиотеки, обогащенной вариантами фрагментов антител, взаимодействующих с антигеном с высокой аффинностью. Данный цикл повторяется от двух до четырех раз (5) до тех пор, пока фракция высокоаффинных антител не станет доминирующей. Для увеличения аффинности отобранных антител их гены выделяют из фаговых частиц (6) и, используя метод мутагенеза, создают их новые варианты (7). Полученные гены клонируют в плазмиды (8), которыми трансформируют клетки *E. coli* (8), в результате чего получают новую библиотеку фрагментов антител, экспонированных на поверхности фаговых частиц (9), которая может быть использована для следующего цикла отбора (1) и дальнейшего увеличения аффинности.

Результатом использования фагового дисплея является отбор высокоаффинных вариантов антител, гены которых могут быть выделены из фаговых частиц (6) для последующего клонирования и экспрессии (по материалам статьи [117]).

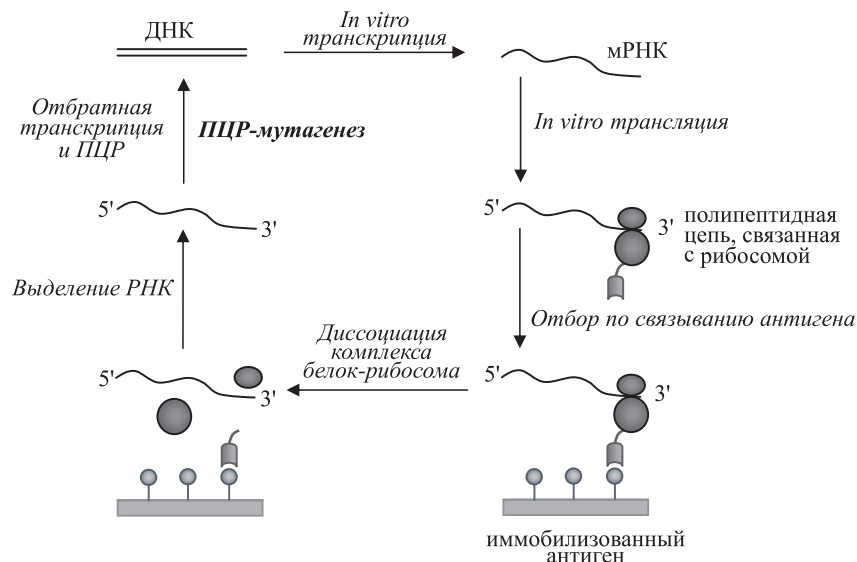


Рис. 4. Рибосомный дисплей.

Библиотека генов антител (например, scFv фрагментов) транскрибируется и транслируется *in vitro*. В полученной мРНК отсутствует стоп-кодон, что позволяет сохранить комплекс рибосома-белок, которые подвергаются в дальнейшем отбору на иммобилизованном антигене аналогично отбору при фаговом дисплее. Отобранные комплексы используют для получения мРНК, используемой в качестве матрицы для обратной транскрипции и для ПЦР. В нуклеотидную последовательность могут быть введены точечные замены, приводящие к созданию новых вариантов фрагментов антител, которые могут быть использованы в следующем цикле.

Молекулы ДНК, кодирующие отобранные за несколько циклов дисплея высоко-аффинные варианты антител, могут быть получены посредством обратной транскрипции молекул мРНК и ПЦР и использованы для последующего клонирования и экспрессии (по материалам статей [102, 213]).

антител вместе с их мРНК. Рибосома в данном случае выполняет функцию стабилизатора комплекса. Далее мРНК подвергают обратной транскрипции, получая кДНК, которую амплифицируют методом ПЦР, а полученные ПЦР-продукты используют для создания плазмид для экспрессии рекомбинантных фрагментов антител. Описаны как прокариотический, так и эукариотический рибосомные дисплеи [80].

мРНК дисплей

Для получения рекомбинантных антител используют также метод мРНК дисплея («mRNA display», «*in vitro virus*», «RNA-peptide fusion») [89, 100]. Идея этого метода заключается в том, что синтезированная

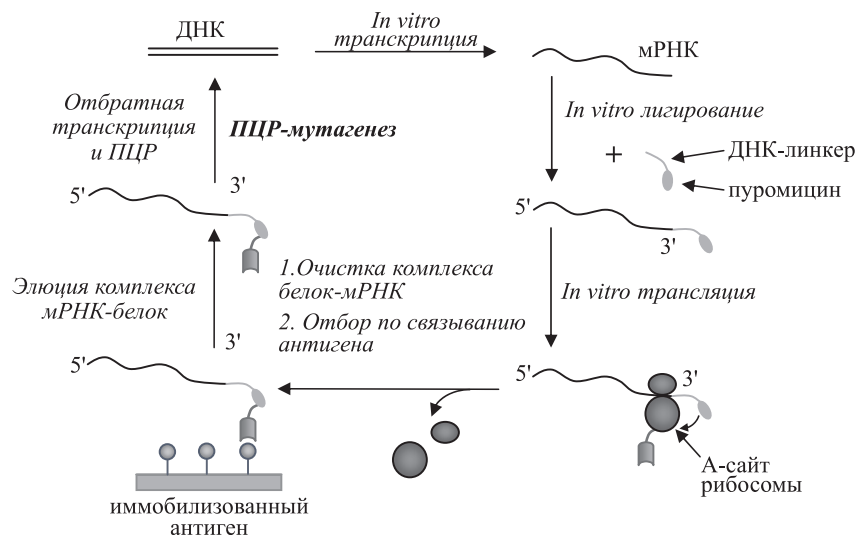


Рис. 5. Метод мРНК дисплея.

Библиотека генов антител (например, в форме scFv фрагментов) транскрибируется *in vitro*. Путем лигирования транскрибированной мРНК с пурамицином с помощью ДНК-линкера можно создавать комплексы мРНК-синтезированный белок. При этом, завершая *in vitro* трансляцию, рибосома останавливается на месте «соединения» РНК и ДНК, а пурамицин связывается с А-сайтом рибосомы, после чего синтезированный белок транслируется на пурамицин. Полученный ковалентный комплекс мРНК-белок может использоваться для отбора по аффинности аналогично отбору при фаговом дисплее, а затем, после элюции, для обратной транскрипции и амплификации кДНК методом ПЦР. Разнообразие вариантов последовательности может создаваться на основе кДНК путем мутагенеза (по материалам статьи [102]).

in vitro полипептидная цепь остается взаимодействовать с кодирующей ее молекулой мРНК за счет пурамицинового линкера, связывающего две молекулы между собой. Поэтому на основе иммунохимических свойств синтезированного белка может быть отобрана и соответствующая мРНК (рис. 5). Далее поступают, как описано в разделе «Рибосомный дисплей».

Таким образом, как мы видим, существует множество способов отбора и получения наиболее аффинных вариантов антител из генных библиотек. В данный момент самым распространенным является метод фагового дисплея. Однако более поздние подходы, использующие *in vitro* системы трансляции белка и не требующие трансформации (мРНК и рибосомный дисплей), позволяют осуществлять скрининг библиотек большего размера, чем в случае фагового дисплея [75,

101–102]. Одним из ограничений дисплейных методов является неравномерность экспрессии различных мутантных форм антител. Возможны ситуации, когда наличие единственной аминокислотной замены полностью блокирует экспрессию мутантной формы антитела [103]. Кроме этого, при наличии библиотек, состоящих из большого числа вариантов, например, 10^{10} – 10^{13} , возникают сложности, связанные с невозможностью рассмотрения и анализа каждого варианта. Этот момент следует учитывать при создании и использовании подобных библиотек.

Методические приемы отбора наиболее аффинных вариантов антител с использованием антигена

Для получения высокоаффинных антител необходимо дифференцировать антитела с низкой и высокой аффинностью. Для этого можно использовать методы отбора по кинетическим или термодинамическим параметрам антител (рис. 6) [102, 104]. Для отбора по термодинамическим параметрам (в равновесном состоянии) библиотека отбираемых антител инкубируется с антигеном, имеющим более низкую концентрацию, чем желаемое значение K_D комплекса антиген-антитело. После достижения равновесия в системе будут преобладать иммунные комплексы, образованные антителами с более высоким аффинитетом, а антитела с низким аффинитетом окажутся в несвязанном виде. Отбор образовавшихся иммунных комплексов позволяет получить антитела с наивысшими значениями аффинности. Однако такой метод требует длительного времени инкубации (до недели!) для установления равновесия. Поэтому лишь очень небольшое количество антител с улучшенными свойствами может быть найдено. Способ отбора по кинетическим параметрам [94, 105–106] («off-rate selection»), заключается в инкубации библиотеки антител с небольшим количеством меченого (или сорбированного) антигена, концентрация которого близка к K_D комплекса анализируемых антител и антигена. На следующем этапе эта смесь инкубируется с большим избытком свободного антигена, причем длительность инкубации увеличивается на каждом последующем шаге отбора. Добавление избытка свободного антигена делает диссоциацию отбираемых антител от меченого (или сорбированного) антигена практически необратимой. Слабо связанные молекулы антител, имеющие наибольшую скорость диссоциации, образуют комплекс со свободным антигеном и затем удаляются с помощью отбора, а молекулы антител с наименьшей скоростью диссоциации остаются связанными с меченым или сорбированным антигеном и отбираются для дальнейших работ.

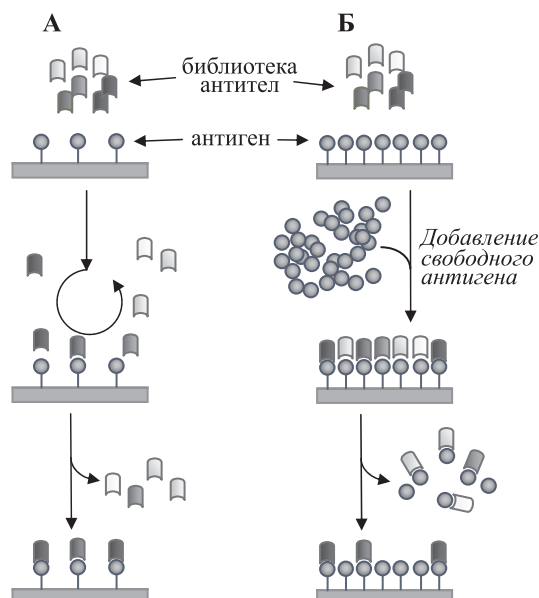


Рис. 6. Две стратегии отбора наиболее аффинных антител (см. объяснения в тексте).

А) Равновесный отбор. Отбираемые антитела инкубируются с недостатком антигена. После достижения равновесия связанными с антигеном остаются, преимущественно, более аффинные антитела.

Б) Отбор по кинетическим параметрам. Отбираемые антитела инкубируются с достаточным количеством связанного антигена, после чего к смеси добавляется свободный антиген. В комплексе со связанным антигеном остаются только антитела, обладающие наименьшей скоростью диссоциации (и, поэтому, большей аффинностью).

Экспрессия рекомбинантных антител

В зависимости от поставленной задачи экспрессию рекомбинантных антител и их фрагментов можно проводить в различных системах: бактериальной (*E. coli*), дрожжевой (*Pichia pastoris*), бакуловирусной (клеточная линия sf9) и в клетках млекопитающих (например, клеточные линии CHO и HEK293) [107]. Для экспрессии негликозилированных фрагментов антител небольшого размера (V_L , V_H , scFv, dsFv), а также Fab-фрагментов как правило используют бактериальную и дрожжевую системы экспрессии. В случае получения полноразмерных антител, где необходимо, чтобы молекула антитела была гликозилирована, часто используют клетки млекопитающих и бакуловирусную системы экспрессии. В случае бактериальной и

дрожжевой экспрессионной систем часто удается достичь высоких выходов рекомбинантных фрагментов (20–1000 мг/л культуральной среды). Однако при экспрессии может возникать целый ряд проблем, затрудняющих получение функциональных фрагментов антител: 1) неправильное образование дисульфидных связей и, как следствие, большое количество функционально неактивного белка и наличие олигомеров синтезированных фрагментов, 2) потеря функциональной активности вследствие приобретения мутаций, 3) протеолиз синтезированного белка под действием внутриклеточных пептидаз. В случае эукариотической и бакуловирусной систем выходы несколько ниже (1–10 мг/л и 10–100 мг/л, соответственно), но при этом, как правило, практически весь синтезированный белок оказывается функционально активным.

Таким образом, использование методических подходов, рассмотренных выше, позволяет получить рекомбинантные антитела или их фрагменты, пригодные для реализации практически любых научно-исследовательских и прикладных задач.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ

Благодаря ряду преимуществ, которыми обладают рекомбинантные антитела и их фрагменты, сфера их возможного применения значительно шире, чем у моноклональных антител, причем в первую очередь – из-за возможности их использования в качестве терапевтических агентов при лечении различных заболеваний.

Как уже отмечалось выше, важным преимуществом антител, полученных с использованием генно-инженерных технологий, является возможность модифицировать их последовательность и вносить изменения, необходимые для реализации каждой конкретной задачи. Методы генной инженерии позволяют преодолевать такие свойства моноклональных антител, затрудняющие применение в клинической практике, как, например, повышенная иммуногенность. Для снижения иммуногенности моноклональных антител, участки, вызывающие иммунный ответ (как правило, это константные домены), заменяют на соответствующие последовательности антител человека. Такие антитела называют «химерными» и они сохраняют антигенную специфичность благодаря уникальным переменным доменам. Для дальнейшего понижения иммуногенности получают *гуманизированные* (почти полностью «замещенные») антитела, в которых от антител мыши остаются только участки переменных доменов, непосредственно взаимодействующие с антигеном, а все остальные части молекулы замещаются на последовательность человеческих иммуноглобулинов [14].

Таким образом, описанные выше модификации антител существенно расширили их применение в клинической практике. Область применения терапевтических антител включает лечение рака, аутоиммунных, респираторных, сердечно-сосудистых, инфекционных и многих других заболеваний. Терапевтические антитела также используют для снижения вероятности отторжения трансплантатов. Применение рекомбинантных фрагментов антител успешно развивается в настоящее время [108–109]. Определенным затруднением при использовании терапевтических антител может быть изменчивость молекул-мишеней, таких как вирусные и бактериальные белки, а также возможность развития у больного иммунной реакции даже на практически полностью гуманизированные антитела.

Для усовершенствования рекомбинантных антител с целью применения в научно-исследовательской деятельности, можно изменять такие свойства антител, как аффинность и специфичность, а также вводить в последовательность антител дополнительные а.о. для последующего конъюгирования с другими молекулами, в том числе и метками, и добавлять к последовательности антител короткие аминокислотные последовательности («таги»), которые позволяют существенно упростить процедуру очистки антител [80, 110]. Кроме этого, генно-инженерные технологии позволяют создавать антитела к тем антигенам, которые не обладают иммуногенностью или токсичны для животных, и которые поэтому сложно получить, используя гибридную технологию.

Одним из наиболее перспективных направлений развития технологии получения рекомбинантных антител является получение антител, обладающих более высокой аффинностью, чем исходные природные антитела. В следующем разделе будут подробно рассмотрены современные подходы, разработанные для искусственного увеличения аффинности антител.

IV. УВЕЛИЧЕНИЕ АФФИННОСТИ АНТИТЕЛ

Как уже отмечалось, увеличение аффинности является естественным процессом, связанным с созревaniem антител в организме позвоночных. Исследование механизмов этого процесса позволило обозначить основные принципы искусственного изменения последовательности антител с целью получения более высокоаффинных вариантов.

Естественные способы увеличения аффинности антител, такие, как рекомбинация генных сегментов и соматическая гипермутация, имеют свои ограничения. Рекомбинация генных сегментов ограни-

чена существующим в организме набором генных сегментов, которые используются для создания гена антитела, а соматическая гипермутация происходит большей частью в районе «горячих точек» мутагенеза, и в этом процессе преобладают однонуклеотидные замены. В результате, часть последовательности антител остается практически неизменной, и некоторые типы мутаций, требующие замены более чем одного нуклеотида в кодоне, становятся маловероятными [33]. В случае же искусственного мутагенеза становится возможным увеличение количества вариантов антител по сравнению с естественными природными вариантами, например, путем замен тех а.о., которые редко подвергаются мутагенезу *in vivo* [111]. При проведении искусственного мутагенеза можно осуществлять редкие в естественных условиях аминокислотные замены, обусловленные изменением более чем на один нуклеотид в кодоне. Благодаря применению эффективных методов отбора могут быть получены рекомбинантные антитела, аффинность которых выходит за пределы значений аффинности («affinity ceiling») естественных антител, и константа диссоциации которых может достигать значений 10^{-10} М и ниже.

Несмотря на наличие множества разнообразных программных продуктов, предназначенных для моделирования взаимодействия антитело-антиген, в настоящее время очень сложно (практически невозможно) точно предсказать какая именно одна или несколько мутаций приведут к увеличению аффинности антитела. Поэтому часто возникает необходимость получения и тестирования множества разнообразных мутантов. Для этого может быть использован метод «*in vitro* эволюции» [7, 101–102], основой которого, также как и при естественном увеличении аффинности, является принцип последовательного создания разнообразия и осуществления отбора наиболее высокоаффинных вариантов антител. Согласно этому принципу, наиболее высокоаффинные антитела отбирают, а кодирующие их гены амплифицируют, а затем подвергают мутагенезу и отбору. После этого цикл повторяется (рис. 7). Таким образом, для увеличения аффинности антитела его фенотип должен быть каким-то образом физически совмещен с генотипом. Для отбора наиболее аффинных мутантных форм антител используются те же методы дисплея, что и при получении рекомбинантных антител *de novo*.

Системы для увеличения аффинности антител разделяют на «полностью *in vitro* подходы», которые предполагают проведение *in vitro* всех этапов «молекулярной эволюции» (создание генетического разнообразия, экспрессию всех возможных вариантов, отбора наилучших вариантов), и «частично *in vitro*» подходы, для которых часть вышеперечисленных этапов происходит внутри клеток, а часть

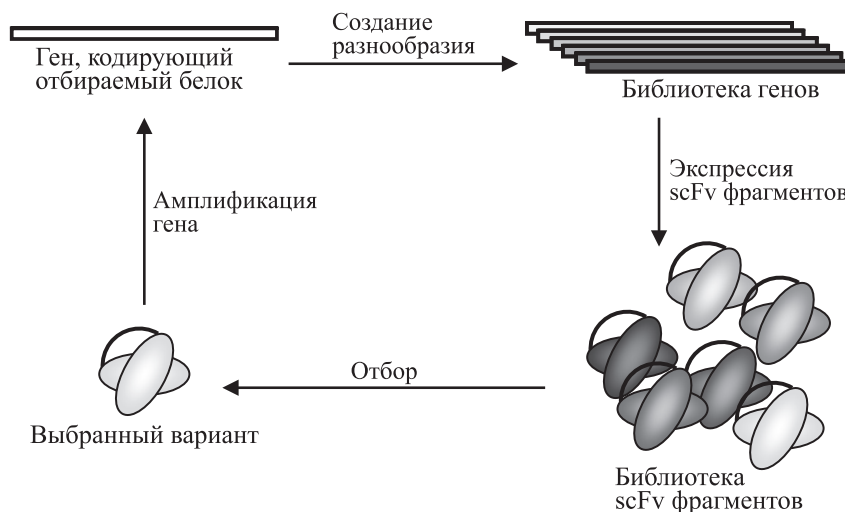


Рис. 7. Схема увеличения аффинности антител методом «*in vitro* эволюции» на примере создания scFv фрагментов (по материалам статьи [101]).

осуществляется *in vitro* [101–102]. К «полностью *in vitro*» подходам относят такие методические подходы, как рибосомный дисплей [80, 88] и мРНК-дисплей [89, 100]. К «частично *in vitro*» подходам относят фаговый [87] и клеточный [90–95] дисплеи, для которых необходим этап трансформации библиотек генов антител (встроенных в плазмиду или репликон фага) в клетки бактерий, дрожжей или млекопитающих с целью проведения экспрессии. В случае клеточного дисплея экспрессируемые антитела транспортируются на поверхность клетки, а в случае фагового дисплея бактериальные клетки используют для продукции частиц бактериофагов [103].

За последние 20 лет было разработано большое количество методических приемов, позволяющих создать генетическое разнообразие *in vitro*, которые можно условно разделить на методы случайного и направленного мутагенеза. К первой группе можно отнести разнообразные методы мутагенеза, которые используют, когда нет четкого представления о тех а.о., которые стоит менять, а также методы ДНК-рекомбинации. Ко второй группе можно отнести сайт-направленный мутагенез, а также методы, позволяющие предсказывать структуру антитела и его комплекса с антигеном, – компьютерные методы анализа структуры белков (*in silico*) и кристаллографический анализ (рис. 8).

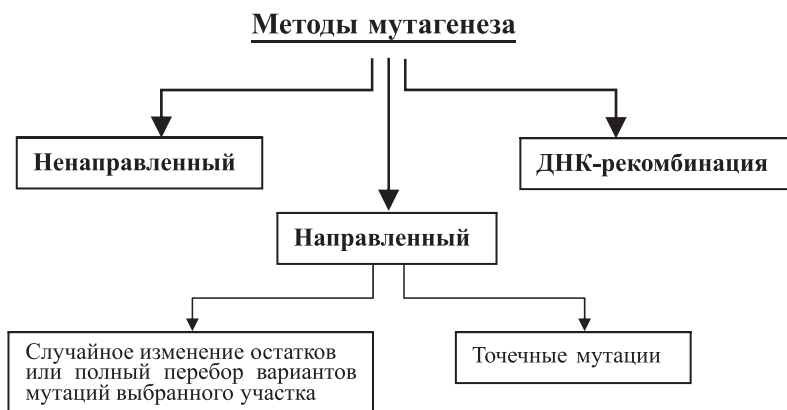


Рис. 8. Классификация методов мутагенеза, используемых для увеличения аффинности антител.

Все методы мутагенеза можно разделить на три группы – направленный и ненаправленный (случайный) мутагенез, а также методы рекомбинации. Ненаправленный мутагенез – это случайное изменение любых аминокислотных остатков последовательности антитела. Особенностью направленного мутагенеза является ограничение количества изменяемых аминокислотных позиций. За счет направленной рандомизации генерируются случайные замены в пределах выбранных аминокислотных позиций. Другим вариантом направленного мутагенеза является полный перебор аминокислотных замен в пределах выбранных участков. И, наконец, точечный мутагенез используется для введения замен выбранных аминокислот.

Использование ДНК рекомбинации позволяет дополнительно увеличить разнообразие библиотек, полученное направленным и ненаправленным мутагенезом, а также совмещать несколько «полезных» мутаций в одной и той же последовательности.

МЕТОДЫ СЛУЧАЙНОГО МУТАГЕНЕЗА

Главное достоинство случайного мутагенеза заключается в том, что для его реализации не нужно иметь данных о структуре антитела и взаимодействующих а.о. Существенным же его недостатком является появление значительной доли функционально неактивных мутантных форм, что приводит к необходимости создавать библиотеки большого размера и затрудняет отбор функционально-активных мутантов. Также в экспериментальных библиотеках, полученных путем случайного мутагенеза, практически не могут быть представлены все возможные варианты аминокислотных замен, поскольку многие из них требуют изменения более чем одного нуклеотида в кодоне,

например, замена 10 из 18 аминокислот, не заряженных отрицательно, на отрицательно заряженную аминокислоту требует изменения двух нуклеотидов в кодоне [112].

Разнообразие вариантов нуклеотидной последовательности антител, полученных с помощью случайного ненаправленного мутагенеза, может быть дополнительно расширено за счет комбинирования нескольких уже полученных вариантов последовательности с использованием методов *in vitro* ДНК рекомбинации (DNA-shuffling) (см. ниже). [99, 113–115].

Модификация аминокислотной последовательности антитела, используемая для увеличения аффинности, может также приводить к таким нежелательным побочным эффектам, как изменение специфичности антитела (кросс-реактивность), стабильности, эффективности экспрессии и сворачивания, токсичности по отношению к клеткам-продуцентам, подверженности олигомеризации. Для терапевтических антител дополнительными побочными эффектами могут быть уменьшение времени полужизни, увеличение иммуногенности, изменение распределения антитела по тканям и склонность к образованию амилоидных структур. Вышеперечисленные факты могут быть следствием не только «благоприобретенных» мутаций, специально введенных исследователем, но также нежелательных мутаций, происходящих из-за неточностей ПЦР реакции или привнесенных с праймерами. Поэтому необходимо дополнительно тестировать отобранные антитела с увеличенной аффинностью на предмет сохранности других важных биохимических свойств [116–117].

Ненаправленный мутагенез

Ненаправленный (случайный) мутагенез – это случайное изменение любых а.о. во всей последовательности антитела. Его главным достоинством является возможность применения в тех случаях, когда нет предварительных данных о структуре комплекса взаимодействующих молекул. Однако для успешной реализации этого подхода необходимо иметь возможность контролировать частоту мутагенеза, поскольку большинство происходящих аминокислотных замен не являются благоприятными и при высокой частоте мутагенеза могут приводить к получению большого количества функционально неактивных вариантов антител. Для увеличения аффинности scFv фрагментов антител оптимальным считается включение двух мутаций на 1000 пар оснований, поскольку при этом наблюдается наибольшее число точечных (33%) и двойных (22%) мутаций на ген, при минимальном количестве генов, не содержащих мутаций (22%) [118].

Для проведения случайного ненаправленного мутагенеза используют несколько подходов. Один из них, так называемый error-prone PCR, заключается в возникновении аминокислотных замен за счет неточности работы ДНК-полимераз при нестандартных условиях проведения ПЦР [92, 119–120]. Важным преимуществом этого подхода является возможность контролировать частоту мутагенеза и ограничивать область возникновения мутаций размером амплифицируемого участка. Существует несколько параметров реакции ПЦР, изменение которых может привести к увеличению количества ошибочно встроенных нуклеотидов. К ним относятся необходимая концентрация бивалентных катионов и соотношение дезоксинуклеозидтрифосфатов в реакционной смеси ПЦР, а также количество циклов ПЦР. Повышение концентрации ионов Mn^{2+} и Mg^{2+} в ПЦР-смеси приводит к увеличению количества мутаций при амплификации. Причем добавление Mn^{2+} в конечной концентрации 0.5 мМ приводит к пятикратному увеличению количества мутаций, и при этом не оказывает влияния на эффективность ПЦР, тогда как при добавлении Mg^{2+} наблюдается не только увеличение количества ошибок, но и падение эффективности амплификации фрагментов в ходе ПЦР-реакции. Еще одним фактором, приводящим к увеличению количества ошибочно вставленных нуклеотидов, является соотношение дезоксинуклеозидтрифосфатов в реакционной смеси. Повышенное содержание одного из них, а также включение в реакционную смесь их аналогов, таких как 8-oxo-dGTP и dPTP, может приводить к увеличению числа неправильно вставленных нуклеотидов [121]. Вероятность появления ошибочных нуклеотидов при низкой скорости мутагенеза также пропорциональна количеству циклов ПЦР [99, 118]. Другим подходом, используемым для появления случайных мутаций, является использование «мутаторных» (mutator strain) штаммов *E. coli*, обеспечивающих накопление мутаций за счет выключенных механизмов коррекции синтезированной ДНК [122–123]. Одним из таких штаммов является штамм mutD5, имеющий дефектную ϵ -субъединицу ДНК полимеразы III, которая в норме имеет 3'-5'-экзонуклеазную активность и обеспечивает удаление неправильно вставленных нуклеотидов. Скорость мутагенеза в клетках бактерий «мутаторных» штаммов зависит от условий роста бактерий: в обычной среде, содержащей минимум питательных веществ, скорость мутагенеза приблизительно в 50 раз выше чем в штамме дикого типа, а в обогащенных средах она может возрастать в 10^3 – 10^5 раз. Среди возникающих мутаций преобладают транзиции, хотя встречаются и трансверсии и сдвиги рамки считывания.

Скорость мутагенеза конкретных нуклеотидов сильно зависит от нуклеотидного окружения. Мутагенез последовательности антигенов по многим параметрам сходен с процессом соматической гипермутации. Во-первых, частота мутагенеза сходна с частотой мутагенеза при соматической гипермутации (3–5 мутаций на 10^4 пар оснований), во вторых, соотношение типов мутаций сходно с соотношением, наблюдаемым при соматической гипермутации, в третьих, мутации распределены неравномерно по последовательности и в большем количестве встречаются вблизи определенных консенсусных последовательностей («hotspots»), таких как AGY-мотив [122]. Преимуществом данного подхода по сравнению с подходами, основанными на методе ПЦР, является возможность более удобного контроля скорости мутагенеза, а также отсутствие необходимости проведения большого количества генно-инженерных операций. Недостатками этого метода является необходимость проведения нескольких раундов мутагенеза, а также постоянного контроля экспрессии антител, поскольку появление мутаций может происходить в любом месте последовательности вектора и приводить к прекращению экспрессии антител [124].

Увеличение аффинности антитела методом рекомбинации

Для увеличения количества вариантов, полученных методом случайного мутагенеза, и для получения комбинаций из нескольких мутаций часто применяется комбинирование участков ДНК, кодирующих гены антител. В зависимости от типа комбинируемых участков выделяют комбинирование вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей (chain shuffling), петель CDR (CDR shuffling), а также комбинирование случайных гомологичных участков последовательностей нескольких мутантных вариантов антител (DNA shuffling) [125].

Существует несколько методических подходов для осуществления рекомбинации антител. Один из них основан на фрагментации и частичной деградации пула молекул ДНК, кодирующих аминокислотную последовательность нескольких вариантов антител, под действием эндонуклеазы ДНКазы I с последующим использованием ПЦР для получения гибридных молекул ДНК («sexual PCR», DNA shuffling). Данная процедура состоит из трех этапов. Первый этап – получение набора случайных фрагментов исходных двух и более родительских последовательностей, которые затем подвергают ПЦР в отсутствие праймеров. На этой стадии происходит рекомбинация за счет отжига частично комплементарных фрагментов, выступающих в качестве праймеров. Последний этап заключается в проведении ПЦР

с использованием праймеров, ограничивающих исходный ген, для получения из пула фрагментов ДНК достаточного количества полно-размерных молекул [111, 114, 126]. Другим методическим приемом является использование ПЦР с перекрывающимися праймерами (overlap extension PCR) [127], который можно использовать как для перебора различных сочетаний из легкой и тяжелой цепей, так и разных участков CDR [125]. Еще одним способом, основанным на использовании ПЦР, является процесс «ступенчатой» амплификации (StEP, staggered extension process), при которой комплементарный синтез ДНК («элонгация») периодически прерывается денатурацией двуцепочечной ДНК, после чего происходит образование ДНК дуплексов («отжиг») между недосинтезированным фрагментом ДНК и новой молекулой матрицы, а затем элонгация цепи продолжается. В результате образуются цепи ДНК, составленные из участков, комплементарных разным матричным молекулам ДНК [128]. Еще одним методом, используемым для рекомбинации, является обработка пула молекул ДНК, кодирующих гены антител, одинаковым набором эндонуклеаз рестрикции с последующим лигированием образованных фрагментов ДНК. При этом порядок фрагментов ДНК в образующихся молекулярно-генетических конструкциях сохраняется благодаря уникальности рестриктных сайтов, но новообразованные конструкции представляют собой продукт объединения фрагментов, образованных из нескольких молекул ДНК. Следует отметить, что ДНК-рекомбинацию можно использовать также для комбинирования нескольких мутантных вариантов, полученных методами направленного мутагенеза (см. ниже).

Хотя случайные подходы для создания генетического разнообразия активно использовали в прошлые годы и используют сейчас, в настоящее время технология увеличения аффинности интенсивно развивается в направлении создания генетического разнообразия с помощью методов направленного мутагенеза.

НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ

Подходы для выбора будущих мишеней мутагенеза

Для применения точечного мутагенеза необходимо иметь информацию о том, какие а.о. подвергать мутагенезу. Для выбора сайтов мутагенеза используют несколько различных подходов. Так, например, с этой целью могут быть использованы данные о положении горячих точек мутагенеза в последовательности антитела. Особенно ценной для выбора участков для направленного мутагенеза может быть информация о трехмерной структуре комплекса антитело-антиген.

Данные о трехмерной структуре антител и их комплексов с антигеном могут быть получены как с использованием экспериментальных методов (рентгеноструктурный анализ или ядерный магнитный резонанс), так и с помощью *in silico* моделирования (*in silico* – «в компьютере») в случае отсутствия рентгеноструктурных данных [129]. Анализ трехмерной структуры обладает рядом преимуществ по отношению к анализу последовательности антитела, так как позволяет предположить изменение каких а.о. может привести к увеличению аффинности антител, исходя из вклада отдельных аминокислот в поддержание стабильности структуры антитела и во взаимодействие с антигеном. Использование анализа последовательностей антител, анализа трехмерных структур и комплексов антител с антигеном с последующим направленным мутагенезом (рациональный дизайн), имеет ряд преимуществ по сравнению со случайным мутагенезом. Во-первых, такой подход позволяет значительно сократить число а.о., подвергаемых мутагенезу до нескольких аминокислотных позиций, значительно увеличивая при этом вероятность нахождения благоприятных мутаций. Кроме этого, процесс направленного мутагенеза может быть разбит на несколько параллельных тестирований небольших библиотек. Небольшой размер этих библиотек по сравнению с размером библиотек, получаемых при случайном мутагенезе, приводит к значительному сокращению количества тестируемых вариантов антител и позволяет уменьшить риск возникновения ложноотрицательного результата, то есть риск не обнаружить улучшенный вариант из-за недостаточной полноты библиотеки или из-за невозможности провести эффективное скринирование всех существующих вариантов с использованием технологии дисплея [130].

Существуют два фактора, ограничивающие возможности методов рационального дизайна. Первый фактор – это невозможность абсолютно точно предсказать воздействие даже единичных аминокислотных замен на аффинитет мутанта с использованием существующих на данный момент алгоритмов расчета. Однако в некоторых случаях точность предсказаний методом *in silico* моделирования воздействий от возможных перестроек оказывается достаточно высокой, и уже существуют примеры дизайна новых более аффинных антител на основе предсказанных изменений в уже существующих антителах [131–132].

Второй ограничивающий фактор – это необходимость проверки астрономического количества возможных мутаций [133]. Для перебора всех возможных а.о. в каждой позиции (насыщающий мута-

генез) последовательности варьируемых доменов LC и HC (около 230 остатков) требуется тестирование 10^{300} вариантов антител, что невозможно осуществить технически.

In silico подходы

Как показывает практика, результаты, полученные с использованием экспериментальных подходов более надежны, но все они более трудоемки, чем анализ *in silico*. Предварительное упрощение картины за счет анализа последствий мутаций, предсказанных с использованием *in silico* подходов, может значительно облегчить получение конечного результата с использованием экспериментальных методов. Хотя компьютерные подходы сегодня еще не являются полноценной заменой экспериментальных данных, они в некоторых случаях позволяют сузить круг вариантов для экспериментального поиска «благоприятных» мутаций [134]. Таким образом, главной задачей *in silico* анализа применительно к проблеме увеличения аффинности антител является изучение влияния аминокислотных замен на структуру самого антитела, а также на структуру и прочность иммунного комплекса для выявления тех замен, которые потенциально приводят к увеличению аффинности взаимодействия антитела и антигена.

Предсказание «вредных» мутаций по последовательности. В ситуации, когда отсутствуют данные о трехмерной структуре антитела и о а.о., вовлеченных во взаимодействие с антигеном, используя анализ аминокислотной последовательности антитела с использованием *in silico* подходов можно значительно сузить круг остатков, подвергаемых мутагенезу для увеличения аффинности антител, исключив те остатки, мутагенез которых может с высокой вероятностью привести к нарушению структуры антитела. К таким остаткам можно отнести FR остатки, консервативные CDR-остатки, а также аминокислотные остатки, боковые цепи которых расположены внутри домена. Методы компьютерного моделирования используют различные приемы для предсказания эффекта мутаций в последовательности антител и могут использовать разные входные данные для анализа – от последовательности а.о. до координат атомов в трехмерной структуре. Они также позволяют комбинировать доступную информацию с тем, чтобы улучшить точность предсказаний (методы, используемые в программах SNPs3d [135], SIFT [136], PolyPhen [137-140], SNAP [141]). Ряд программ позволяет оценивать энергетический эффект аминокислотных замен на стабильность антител и их комплексов с антигенами (программы FOLD-X [142], CHARMM [143–145], SNPeffect [146], LS-SNP [147], I-Mutant2.0 [148] и PoPMuSiC [149]).

Таким образом, использование *in silico* подходов для антител с неизвестной пространственной структурой позволяет уменьшить размер скринируемых библиотек за счет исключения из списка генерируемых мутаций потенциально вредных.

Идентификация «горячих точек» мутагенеза. Для увеличения аффинности антител с неизвестной трехмерной структурой также используется метод мутагенеза по «горячим точкам», идея которого состоит в использовании *in vitro* того принципа, который используется для естественного увеличения аффинности антител в ходе соматической гипермутации. Как и в случае поиска «вредных мутаций», поиск «горячих точек» мутагенеза проходит посредством анализа последовательности антител.

Процесс локализации а.о., соответствующих «горячим точкам» мутагенеза, то есть участкам нуклеотидных последовательностей, которые наиболее часто изменяются в ходе соматической гипермутации, состоит из трех этапов: 1) поиск участков V-генов, соответствующих вариабельным доменам данного антитела, 2) поиск консенсусных последовательностей, характерных для горячих точек мутагенеза в последовательностях V-генов, 3) определение остатков в аминокислотной последовательности, соответствующих «горячим точкам» мутагенеза для данного антитела. Для этого в базе данных IGMT [150] проводится поиск последовательностей V-генов, наиболее близких по последовательности вариабельным доменам данного антитела. Затем, в найденных последовательностях V-генов нужно локализовать все участки, совпадающие с консенсусными последовательностями RGWY (A/G G C/T A/T) и AGC и AGT [27–28]. При мутагенезе а.о. из CDR-H3 следует избегать «горячих точек», в состав которых входят нуклеотиды, добавленные при рекомбинации генных сегментов (V(D)J-рекомбинация) в процессе генерации генов антител.

Выделяют два типа нуклеотидных последовательностей «горячих точек»: первичные (germline hot spots), которые содержатся в первичных антителах и генных сегментах, из которых эти антитела получены, и вторичные (non-germline hot spots), которые отсутствуют в первичных антителах и являются, по-видимому, результатом соматической гипермутации [27–28, 33, 151–153]. Результаты исследований по мутагенезу последовательностей этих двух типов «горячих точек» показали, что изменение именно первичных «горячих точек» эффективно для увеличения аффинности антител [33]. При осуществлении мутагенеза необходимо рандомизировать все кодоны, входящие частично или полностью в выбранные «горячие точки» [27].

In silico моделирование трехмерной структуры комплекса антитело-антиген и *in silico* мутагенез. По сравнению с анализом первичной последовательности антител построение трехмерной структуры антитела и его комплекса с антигеном представляет собой более сложную задачу. Для увеличения аффинности антитела с использованием методов *in silico* исследователи, как правило, стараются предсказать мутации, которые позволят увеличить а) количество а.о. антитела, взаимодействующих с антигеном, б) силу взаимодействий между антигеном и антителом. Как правило, подобные изменения приводят к увеличению аффинности за счет ослабления диссоциации (k_{off}). Для увеличения же скорости ассоциации существует подход, основанный на изменении зарядов на поверхности молекулы антитела за счет внедрения заряженных остатков вблизи взаимодействующих поверхностей. Считается, что появление таких остатков в структуре антитела приводит к облегчению правильной ориентации молекулы антигена по отношению к антителу, но не приводит к образованию новых связей между антигеном и антителом [154–155].

Важным условием для увеличения достоверности *in silico* предсказания конкретных аминокислотных замен, приводящих к увеличению аффинности антитела, является наличие трехмерной структуры комплекса антитело-антиген с высоким разрешением. Однако из-за того, что для подавляющего большинства антител кристаллическая структура комплекса неизвестна, вместо нее часто используют трехмерные модели. Процесс моделирования комплекса антитело-антиген состоит из трех этапов: 1) моделирование трехмерных структур антитела и антигена по отдельности и оптимизация моделей, 2) докинг, то есть «совмещение» моделей антитела и антигена с образованием виртуального комплекса, и, наконец, 3) анализ энергии образования комплекса антитело-антиген для всех возможных мутантных форм с последующим отбором мутантных форм с минимальным значением этой энергии.

Для моделирования трехмерной структуры белков используют два основных приема: гомологическое моделирование и *de novo* моделирование. Моделирование на основании гомологии, использует доступные данные в базе данных трехмерных структур PDB (Protein Data Bank) в качестве основы для моделирования белков с неизвестной структурой. Сначала осуществляется поиск белков, обладающих наибольшим сходством последовательностей с изучаемым белком, а затем происходит построение модели на основе гомологии, которое заключается, главным образом, в «натягивании» последовательности

моделируемого белка на «остов» шаблона, составленного на основе найденных гомологичных структур [156–157]. Согласно исследованиям, проводимым в рамках CASP (Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction), моделирование структуры белков по гомологии можно проводить только в случае, если структуры гомологичных белков идентичны более чем на 30% [157]. В случае белков, для которых отсутствуют гомологичные им по всей последовательности белки с известной структурой, разработан аналогичный гомологичному моделированию метод, использующий гомологию отдельных структурных элементов с известной третичной структурой (protein threading) [158–159]. Существует множество автоматических инструментов для гомологического моделирования трехмерной структуры разных белков, таких как MODELLER [160], SWISS-MODEL [161], I-TASSER [162], 3D-JIGSAW [163], ESyPred3D [164], Phyre [165], CPHmodels [166] и др. Эти инструменты могут быть быстро и легко использованы для моделирования различных белков, но они не позволяют учесть особенности антител, поэтому использование этих программ с небольшой вероятностью может привести к получению качественной модели.

Идея второго подхода заключается в моделировании процесса и результата сворачивания белка (программы Rosetta [167] и TASSER [168]). Этот подход может быть реализован путем генерации и последующей оценки множества вариантов сворачивания в зависимости от значения потенциальной энергии. Поиск считается законченным, если найдена конформация, обладающая значительно более низкой энергией по сравнению со всеми остальными возможными конформациями. Для того, чтобы воспроизвести природный механизм формирования структуры белковой молекулы, исследователи пытаются выделить в последовательности структурные элементы, которые сворачиваются первыми и остаются неизменными в ходе дальнейшего сворачивания. Процедура *de novo* моделирования является чрезвычайно сложной и требует огромных компьютерных ресурсов, поэтому данные алгоритмы чаще используются совместно с гомологическим моделированием для оптимизации полученных моделей, например, для моделирования структуры петель.

Моделирование структуры антител имеет свои особенности. Последовательность каркасных участков настолько консервативна, что задача большей частью сводится к моделированию шести CDR-петель [169]. Однако для построения модели комплекса антитела с антигеном методом докинга необходимо получить очень точную модель паратопа, что сильно усложняет задачу [129].

Для нахождения соответствия между а.о. последовательностей разных антител и для правильного гомологического моделирования CDR петель необходимо иметь систему обозначения аминокислотных позиций в последовательностях переменных доменов антител. Также надо определить принципы выделения фрагментов антитела, участвующих во взаимодействии с антигеном. Для этих целей предлагается использовать такие критерии, как профиль вариабельности аминокислот [170], топология а.о. [171–173], оптимизированная модель трехмерной структуры петель, взаимодействующих с антигеном («AbM loops») [174], последовательности V-генов κ и λ LC, а также последовательности HC и доменов T-клеточных рецепторов [150, 175], и роль а.о. во взаимодействии с антигеном [176].

Таким образом, как мы видим, на данный момент не существует универсальной нумерации аминокислотных остатков и не определены «универсальные границы» антигенсвязывающих участков. Авторы не пытаются переопределить границы CDR, а выделяют альтернативные наборы а.о., перекрывающихся с CDR, которые могут быть использованы исследователями для разных целей [169].

Для построения трехмерных структур CDR-петель методом гомологического моделирования в качестве шаблонов используются структуры петель антител, относящихся к разным структурным группам («каноническим классам»), определенным в работах Хотиа [171–173]. Для этого из баз данных структур выбираются петли антител, относящиеся к тому же классу, что и петли моделируемого антитела и совпадающие с последовательностью петель моделируемого антитела по максимальному количеству аминокислотных позиций. Петли V_H CDR3 слишком вариабельны, поэтому не могут быть четко разделены на канонические классы, однако среди них тоже выделяют группы. Для моделирования CDR-петель, которые не могут быть отнесены к определенной структурной группе используется метод *ab initio* моделирования петель, а также метод конформационного поиска [174, 177]. Иногда в качестве шаблона для построения структуры петли используют структуру петли той же длины, имеющую похожее расстояние между точками прикрепления к каркасному участку [169]. При моделировании каркасных участков вариабельного домена необходимо проверять найденные в базах данных гомологичные структуры для использования в качестве шаблонов на наличие участков с низким разрешением и заменять такие участки консенсусными конформациями других известных структур [178].

Для моделирования вариабельных фрагментов антител существует несколько специальных программ: WAM (Web Antibody Modelling) [179–180], PIGS (Prediction of Immunoglobulin Structure) [181] и

RosettaAntibody [182]. Каждая из них использует для построения модели антитела комбинированные методы анализа структур, поэтому использование этих программ более эффективно, чем автоматическое моделирование с использованием универсальных программ для моделирования белков. Принцип метода, используемого в программах, специализированных для моделирования антител, заключается в создании модели на основе шаблона каркасных участков переменного домена путем пересадки шаблонов петель или моделирования структуры петель *de novo*. Серверы PIGS и WAM не проводят оптимизации с высоким разрешением для полученной модели и не рассматривают термодинамические параметры при моделировании [182], тогда как первоначальная модель, полученная в программе RosettaAntibody, на следующем этапе подвергается оптимизации сначала на уровне низкого, а затем – высокого разрешения.

Программа моделирования антител RosettaAntibody представляет собой наиболее развитый инструмент для моделирования антител. Она сочетает разные принципы моделирования CDR-петель, такие, как использование канонических классов, гомологичных петель антител, имеющих в базах данных структур, конформационный поиск [174, 177] и *de novo* моделирование петли H3 при отсутствии ее структуры в базе данных. Кроме того, программа RosettaAntibody проводит многоступенчатую оптимизацию полученной структуры и взаимной ориентации V_L и V_H доменов с учетом влияния на взаимное расположение каркасных участков петли H3, смоделированной *de novo*, и других петель. Для антител, имеющих высокое сходство с найденным шаблоном, точность предсказаний структуры с использованием программы RosettaAntibody в дальнейшем позволяет использовать полученные структуры для построения моделей комплекса антиген-антитело [129].

Моделирование мутантных форм антител на основе имеющейся трехмерной структуры исходного антитела (*in silico* мутагенез) является более простой задачей по сравнению с моделированием антитела с неизвестной структурой, поскольку замены в CDR-петлях влияют только на локальное окружение, оставляя неизменной общую структуру домена [178].

Несмотря на многообразие программных продуктов, разработанных для моделирования белков, часто оказывается так, что определенная *in silico* максимально энергетически выгодная структура белковой молекулы не всегда совпадает с ее оригинальной структурой [129, 178]. Это связано со сложностью корректной оценки всех внутримолекулярных взаимодействий, а также со сложностью

оценки взаимодействия молекулы с растворителем [129]. В связи с этим, наиболее перспективным считается подход, заключающийся в генерации нескольких наиболее правдоподобных моделей (десяти в случае RosettaAntibody) и последующей проверки правильности модели путем виртуальной «стыковки» модели антитела и антигена (метод докинга антитела и антигена). Учет конформационной подвижности антитела и антигена при моделировании структуры комплекса позволяет компенсировать неточности моделирования конформации петель, взаимодействующих с антигеном.

Белок-белковый докинг можно определить как предсказание структуры комплекса двух белков (например, антитела с антигеном), если известны их структуры. В различных программах, предназначенных для докинга, используется либо приближение, согласно которому взаимодействующие белки представляют собой «жесткие» тела с фиксированной конформацией («rigid body» approximation), либо когда они рассматриваются как подвижные структуры [183]. К программам, которые осуществляют «жесткий» докинг, относятся Zdock/Rdock [183], ClusPro [184], 3D-dock [185] и RosettaDock [129, 186]. Эти программы не учитывают изменение конформации белкового остова при взаимодействии белков, однако рассматривают движения боковых цепей аминокислот. Для осуществления докинга с учетом внутримолекулярной подвижности белков («гибкий докинг», flexible docking) существует две модели [186]: 1) модель выбора конформации, согласно которой в свободном состоянии белок представлен набором конформеров с низкой энергией, один из которых способен к связыванию с другим белком и 2) модель индуцированного взаимодействия, согласно которой взаимодействие двух белков приводит к изменению структуры обоих участников взаимодействия. Кроме этого, существуют программы, использующие гибридную модель, согласно которой сначала происходит выбор конформации, завершающийся образованием первичного комплекса, а затем следует индуцированное взаимодействие белков. К программам, осуществляющим «гибкий» докинг, относятся Autodock [187], Dock [188], FlexX [189], Glide [190], Gold [191], HADDOCK [186, 192], ICM [193], Situs [194]. Полный список существующих программ для докинга значительно более обширен и постоянно обновляется. Из всех программ, используемых для докинга, наиболее распространенной на сегодняшний день можно считать программу Autodock [195]. Несмотря на достижения в области *in silico* предсказаний, моделирование гибкости белковых молекул и тех изменений, которые происходят в молекулах при образовании комплекса, остается одной из главных проблем, ограничивающих *in silico* подходы для моделирования белковых комплексов [115].

Для оценки и ранжирования различных конформаций, полученных методом докинга, а также для сравнения аффинности различных мутантных вариантов антител используют оценивающие функции (scoring functions), задача которых заключается в том, чтобы отличить варианты антител, способные образовывать комплекс, от вариантов, которые комплекс формировать не смогут. Также такие функции должны предсказать наиболее вероятную структуру комплекса из всех структур, созданных с использованием программ [195].

Рациональный дизайн на основе результатов моделирования. После анализа последовательности антитела и/или трехмерной структуры комплекса антиген-антитело (либо ее модели) необходимо на основе полученных результатов выбрать а.о., которые следует подвергать мутагенезу на практике. Существует несколько критериев рационального отбора а.о. для последующего направленного мутагенеза.

В качестве мишеней направленного мутагенеза желательно выбирать а.о., входящие в состав CDR-петель, а также, возможно, некоторые FR остатки, которые могут участвовать в непосредственном связывании антигена или могут влиять на взаимодействие антигена с контактирующими остатками [13, 196]. Как правило, мутагенез FR остатков, участвующих в поддержании структуры иммуноглобулинового домена, может приводить к драматическим последствиям [38], а правильное предсказание эффекта изменения а.о., удаленных от центра связывания антигена, на аффинитет антитела маловероятно. При мутагенезе, сопровождающем аффинное созревание, мутации в FR, приводящие к увеличению аффинности за счет потери стабильности, не сохраняются [25]. Примеры увеличения аффинности антител, происходящие в результате мутаций в удаленных от сайта связывания аминокислотах, описаны в литературе [92], однако последствия таких мутаций не могут быть предсказаны *in silico*.

Среди а.о. CDR желательно оставить неизменными те, которые могут играть структурную функцию (образовывать часть «внутреннего ядра» домена, солевые мостики внутри, водородные связи, и т.п.). Эти а.о., как правило, являются консервативными и почти любые замены по этим аминокислотным остаткам приводят к снижению аффинности (deleterious sequence features) [76, 143]. Считается, что в первую очередь в качестве кандидатов на мутагенез надо рассматривать остатки CDR, доступные растворителю и способные к взаимодействию с ним [25, 197]. Такие мутации практически не изменяют общую структуру домена, могут быть вовлечены во взаимодействие с антигеном и эффект увеличения аффинности за счет мутаций этих остатков может быть наиболее точно предсказан.

Выбор «горячих точек» (аминокислотных позиций, которые чаще всего модифицируются при соматической гипермутации) для будущего мутагенеза позволяет увеличить вероятность получения антител с большей аффинностью при создании антител *de novo*, так как имитирует естественный процесс созревания антител. Однако этот подход может быть менее эффективным для увеличения аффинности рекомбинантных антител, полученных из моноклональных антител (уже прошедших через соматическую гипермутацию и обладающих высокой аффинностью), поскольку в процессе созревания их гипервариабельные позиции уже были оптимизированы.

Одним из способов ограничения количества вариантов генов антител, подвергаемых дальнейшему отбору, является уменьшение числа перебираемых типов аминокислот в каждой позиции. Для этого возможным подходом является исключение тех типов аминокислот, которые редко встречаются в CDR и/или редко появляются в ходе естественного созревания антител в В-клетках [25, 198–200]. С другой стороны, введение замен, не встречающихся в природных антителах может позволить достичь тех значений аффинности, которые не были достигнуты за счет ограничений соматической гипермутации. Кроме того, количество вариантов а.о. в каждой позиции может быть ограничено набором аминокислот, представляющих основные физико-химические группы аминокислот [200]. Однако, часто к увеличению аффинности приводят не те мутации, которые кардинально меняют свойства аминокислоты в данной позиции, а «консервативные» замены, которые лишь немного модифицируют характер взаимодействий. Еще один возможный вариант ограничения перебираемых в каждой позиции аминокислот основан на том, что большинство замен между а.о. с сильно различающимися свойствами часто приводит к получению неактивного белка. Поэтому мутагенез следует ограничить заменами на близкие по свойствам а.о. (см. раздел «экономный мутагенез») [17, 201]. Однако такой подход не учитывает те случаи, когда неконсервативные замены приводят к увеличению аффинности.

Для увеличения количества скринируемых позиций используется один из следующих подходов: «последовательный», при котором сначала проводят оптимизацию одного CDR, а затем переходят к другому, используя для каждого нового этапа «*in vitro* эволюции» наиболее оптимизированные на предыдущем этапе антитела и «параллельный», при котором происходит независимая оптимизация разных участков антитела с последующим совмещением «благоприобретенных» мутаций.

Мутагенез а.о. на периферии антигенсвязывающего участка в случае увеличения аффинности моноклональных антител, полученных *in vivo*, может иметь преимущество перед изменением а.о., расположенных в центре, поскольку основные энергетические «горячие точки», расположенные в центре антигенсвязывающего участка, как правило, уже оптимизированы в процессе созревания, и зачастую их изменение может привести только к уменьшению энергии связывания. Периферические а.о. более перспективны для мутагенеза [13, 39, 121, 202], поскольку их изменение позволяет приспособить к связыванию антигена те а.о., которые не были вовлечены в связывание антигена и с меньшим риском может нарушить уже имеющиеся связи. Увеличение аффинности антител за счет периферических остатков может происходить путем увеличения гидрофобной поверхности взаимодействия с антигеном, скрытой от растворителя, сближения и увеличения комплементарности взаимодействующих поверхностей антитела и антигена, усиления электростатических взаимодействий, а также изменения подвижности остатков антигенсвязывающего участка [99, 121, 201, 203–204]. Увеличение аффинности может происходить как за счет увеличения подвижности молекулы антитела, благодаря возможности увеличения комплементарности поверхностей эпитопа и паратопа, так и за счет ее снижения путем фиксации связанной конформации антитела, оптимально связывающей антиген.

При дизайне антитела с увеличенной аффинностью, для его использования в диагностических системах имеет смысл максимально ограничить подвижность молекулы, чтобы минимизировать возможность неспецифических взаимодействий полученного антитела с другими сходными по структуре молекулами. Использование *in silico* мутагенеза, то есть создание моделей мутантных антител с последующей оценкой энергии связывания антигена позволяет предсказывать, какие конкретные точечные замены могут привести к увеличению аффинности антитела. Это – наиболее рациональный из всех описанных подходов, требующий использования трехмерной структуры высокого разрешения. Число известных кристаллических структур комплексов антител и антигенов невелико, однако постоянно растет. Развитие методов предсказания трехмерной структуры наряду с увеличением точности методов моделирования мутированных форм позволит повысить успешность применения метода *in silico* мутагенеза [134, 142–143, 145, 205].

Таким образом, после построения трехмерной структуры комплекса антиген-антитело и определения тех а.о., которые вносят вклад в образование этого комплекса, на следующем этапе проводят направ-

ленный мутагенез этих а.о. и получают некоторое количество вариантов мутантных форм антител, которые затем подвергают отбору.

Методы направленного мутагенеза

Основная идея направленного мутагенеза заключается в том, что для увеличения аффинности, как правило, необходимо подвергать мутагенезу только те а.о., которые расположены в области антиген-связывающего участка и могут быть вовлечены во взаимодействие с антигеном. Выделяют несколько подвидов направленного мутагенеза в зависимости от того, какие остатки изменяют и каким образом (рис. 8). Направленный мутагенез в чем-то аналогичен происходящей *in vivo* соматической гипермутации, т. к. проводится мутагенез ограниченного количества а.о. – остатков, входящих в состав CDR, или небольшого числа остатков, отобранных с использованием *in silico* подходов [101–102, 152, 206]. В рамках направленного мутагенеза может проводиться замена единичных а.о. на другие, определенные заранее (точечный мутагенез), рандомизация в пределах выбранных а.о., или полный перебор всех аминокислотных позиций в пределах выбранных участков. Точечный мутагенез применим для антител с известной трехмерной структурой, когда заранее определено, какую аминокислотную замену следует осуществить, чтобы добиться нужного эффекта.

Точечный мутагенез. Точечный (или сайт-специфический) мутагенез используют для замены одной аминокислоты в определенной позиции последовательности на другую, определенную заранее, аминокислоту. При этом аминокислотные замены проводят методом ПЦР с использованием праймеров, содержащих необходимые мутации. Для перебора вариантов различных типов а.о. в одной и той же позиции последовательности, используют «вырожденные» по данной позиции праймеры, то есть набор праймеров, отличающихся только аминокислотой, вводимой в данной позиции за счет мутации. Такие праймеры имеют идентичную нуклеотидную последовательность за исключением рандомизированного триплета нуклеотидов, соответствующего выбранной для мутагенеза аминокислоте.

Направленная рандомизация и мутагенез с полным перебором вариантов. К этой группе можно отнести некоторые методические подходы, которые включают в себя как случайное изменение выбранных а.о. (рандомизация), так и перебор всех возможных вариантов аминокислотных замен в пределах выбранных а.о. (насыщающий мутагенез).

Оптимизация остатков CDR. Так как одновременная оптимизация всех остатков CDR невозможна из-за ограничений размера тестируемых библиотек, для решения этой проблемы используют три подхода: последовательную («CDR walking») модификацию остатков CDR [106], параллельную модификацию остатков CDR и рандомизацию некоторых CDR-петель. Первый подход предполагает последовательную оптимизацию а.о. в различных участках CDR. Исходным материалом для оптимизации остатков в каждом новом цикле служит последовательность фрагмента антитела с увеличенной аффинностью, полученная за счет оптимизации предыдущих вариантов CDR. Альтернативой этому подходу является стратегия параллельной оптимизации, при которой разные фрагменты CDR подвергают независимой оптимизации, а затем лучшие из отобранных вариантов комбинируют в один ген. Данная стратегия основана на экспериментальных данных, согласно которым при комбинировании не взаимодействующих мутаций наблюдается аддитивный эффект [207], и это часто приводит к положительным результатам [105, 208–209]. Преимуществом такой стратегии является быстрота получения конечного продукта. Однако также имеются данные об отсутствии эффекта аддитивности в случае комбинирования некоторых мутаций [106]. Иногда насыщающий мутагенез только одной или двух главных CDR петель (как правило, V_L -CDR3 или V_H -CDR3, а иногда V_H -CDR2) приводит к повышению аффинности, по-видимому, из-за того, что эти петли вносят основной энергетический вклад во взаимодействие с антигеном [210–212].

Сканирующий мутагенез. Сканирующий мутагенез (look-through mutagenesis), был разработан как схема полной оптимизации всех шести CDR петель для улучшенного связывания антигена. В рамках этого подхода из 20 аминокислот, входящих в состав белков выбирают 9 (аланин, серин, гистидин, лейцин, пролин, тирозин, аспартат, глутамин, лизин), представляющие основные группы аминокислот, выделенные на основе физико-химических свойств их боковых цепей. Для каждой аминокислотной позиции, входящей в состав CDR создается серия мутантных форм, в которых а.о. дикого типа заменяется на одну из девяти выбранных аминокислот. После этого CDR участки, кодирующие единичные аминокислотные замены, сшиваются друг с другом за счет ДНК-рекомбинации с образованием scFv фрагментов, содержащих комбинации одноаминокислотных замен в различных CDR. После отбора полученных клонов на основе их способности связывать антиген, гены клонов с улучшенными свойствами секвенируют и определяют благоприятные мутации, которые затем комбинируют для выявления синергичных мутаций [200].

«Экономный» мутагенез. «Экономный» мутагенез (*parsimonious mutagenesis*) – это метод, позволяющий получать варианты антител с увеличенной аффинностью путем одновременного и полного мутагенеза CDR остатков в библиотеках небольшого размера. Уменьшение размера библиотеки достигается за счет уменьшения избыточности кодирующей последовательности (выбирается по одному кодону для каждого а.о.) и ограничения количества перебираемых в каждой позиции а.о.. Хотя теоретически для каждой аминокислотной позиции, выбранной для мутагенеза, существуют 19 вариантов замены, метод «экономного мутагенеза» ограничивается лишь теми вариантами, которые химически и/или стерически наиболее похожи на а.о. дикого типа. Этот подход также базируется на том принципе, что лишь небольшая доля аминокислот вносит наиболее существенный вклад в связывание антигена, тогда как остальные аминокислоты, входящие в состав антигенсвязывающего участка, могут быть подвергнуты мутагенезу для формирования дополнительных контактов с антигеном [17, 201].

* * *

С помощью перечисленных выше методов (случайный мутагенез, методы *in silico* и рационального дизайна, направленный мутагенез) возможно создание библиотек генетических вариантов исследуемых антител. Дальнейший отбор высокоаффинных вариантов проводят, используя разнообразные методы дисплея, которые были рассмотрены в главе «Получение рекомбинантных антител *de novo*». Следует отметить, что в некоторых случаях получение антител с аффинностью, превышающей аффинность их природных аналогов, трудно осуществимо. Это связано с тем, что в ходе естественного созревания антител в организме и их отбора уже была выбрана оптимальная комбинация аминокислотных остатков антитела, взаимодействующая с антигеном с максимальной аффинностью. Дальнейшее увеличение аффинности такого антитела с использованием комбинаторных методов уже не приведет к получению более высокоаффинного производного.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Антитела являются широко используемым инструментом для научных исследований, диагностики и терапии различных заболеваний. Во многих случаях использование в практической деятельности рекомбинантных антител и их фрагментов имеет ряд преимуществ по сравнению с применением полноразмерных антител, получен-

ных гибридным методом. Благодаря использованию генно-инженерных подходов, позволяющих изменять аминокислотную последовательность антител, можно улучшать такие характеристики антител, как специфичность, аффинность, стабильность, фармакокинетические параметры, эффекторные функции, способность антител проникать в различные ткани, и иммуногенность. Модифицируя вышеперечисленные свойства антител можно создавать новое поколение перспективных антител с улучшенными свойствами для решения научно-исследовательских задач и практической медицины. Дальнейшие перспективы увеличения аффинности антител связаны, прежде всего, с получением антител к тем антигенам, которые потенциально могут представлять терапевтический интерес, а также созданием ультравысокоаффинных антител, чей аффинитет может достигать 10^{-12} М и 10^{-15} М [92, 96, 106, 121, 210, 213]. В будущем, создание антител с такой высокой аффинностью позволит расширить сферу применения антител в научных исследованиях, диагностике и в качестве высокоспецифичных и высокоэффективных терапевтических агентов.

Авторы выражают благодарность и искреннюю признательность за внимательное прочтение обзора и ценные комментарии к.х.н. А.Г.Ламану (ФИБХ имени академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Пущино, Московская область), д.б.н., профессору Н.Б.Гусеву и к.б.н. А.В.Харитонову (Кафедра биохимии, Биологический факультет МГУ, Москва).

ЛИТЕРАТУРА

1. Hagemeyer, C.E., von Zur Muhlen, C., von Elverfeldt, D., and Peter, K. (2009) *Thromb. Haemost.*, **101**, 1012–1019.
2. Hudson, P.J. and Souriau, C. (2001) *Expert Opin. Biol. Ther.*, **1**, 845–855.
3. Arbabi-Ghahroudi, M., Tanha, J., and MacKenzie, R. (2005) *Cancer Metastasis Rev.*, **24**, 501–519.
4. Buchner, J. and Rudolph, R. (1991) *Biotechnology. (N. Y.)*, **9**, 157–162.
5. Cowell, L.G. and Kepler, T.B. (2000) *J. Immunol.*, **164**, 1971–1976.
6. Donzeau, M. and Knappik, A. (2007) *Methods Mol. Biol.*, **378**, 14–31.
7. Honegger, A. Troubleshooting antibody fragments. URL: <http://www.bioc.uzh.ch/antibody/Introduction/VirtualSeminars/AE2003/source/slide01.htm>.
8. Maynard, J. and Georgiou, G. (2000) *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **2**, 339–376.
9. Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E., and Hoogenboom, H.R. (1994) *Annu. Rev. Immunol.*, **12**, 433–455.
10. Schroeder, H.W., Jr. and Cavacini, L. (2010) *J. Allergy Clin. Immunol.*, **125**, S41–52.
11. Volkov, V., Kayushina, R., Lapuk, V., Shtykova, E., Varlamova, E., Malfois, M., and Svergun, D. (2003) *Crystrallography Reports*, **48**, 98–105.
12. Padlan, E.A. (1994) *Mol. Immunol.*, **31**, 169–217.
13. Sundberg, E.J. (2009) *Methods Mol. Biol.*, **524**, 23–36.

14. Kashmiri, S.V., De Pascalis, R., Gonzales, N.R., and Schlom, J. (2005) *Methods*, **36**, 25–34.
15. Padlan, E.A., Abergel, C., and Tipper, J.P. (1995) *FASEB J.*, **9**, 133–139.
16. Duquesnoy, R.J. Structural and functional definitions of epitopes reacting with mouse monoclonal antibodies. URL: HLA Matchmaker Website: <http://www.hlamatchmaker.net>.
17. Balint, R.F. and Larrick, J.W. (1993) *Gene*, **137**, 109–118.
18. Muller, Y.A., Chen, Y., Christinger, H.W., Li, B., Cunningham, B.C., Lowman, H.B., and de Vos, A.M. (1998) *Structure*, **6**, 1153–1167.
19. Saul, F.A. and Alzari, P.M. (1996) *Methods Mol. Biol.*, **66**, 11–23.
20. Nakanishi, T., Hori, M., Tsumoto, K., Yokota, A., Kondo, H., and Kumagai, I. (2007) Photon factory activity report, **25B**, 217.
21. Yokota, A., Tsumoto, K., Shiroishi, M., Kondo, H., and Kumagai, I. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 5410–5418.
22. Chi, S.W., Maeng, C.Y., Kim, S.J., Oh, M.S., Ryu, C.J., Han, K.H., Hong, H.J., and Ryu, S.E. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 9230–9235.
23. Raghavan, M. and Bjorkman, P.J. (1996) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **12**, 181–220.
24. Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R., and Alt, F.W. (2006) *Annu. Rev. Immunol.*, **24**, 541–570.
25. David, M.P., Asprey, J.J., Ibana, J.S., Concepcion, G.P., and Padlan, E.A. (2007) *Mol. Immunol.*, **44**, 1342–1351.
26. Berek, C. and Milstein, C. (1987) *Immunol. Rev.*, **96**, 23–41.
27. Chowdhury, P.S. (2003) *Methods Mol. Biol.*, **207**, 179–196.
28. Ho, M. and Pastan, I. (2009) *Methods Mol. Biol.*, **525**, 293–308, xiv.
29. Tomlinson, I.M., Walter, G., Jones, P.T., Dear, P.H., Sonnhhammer, E.L., and Winter, G. (1996) *J. Mol. Biol.*, **256**, 813–817.
30. Foote, J. and Eisen, H.N. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1254–1256.
31. Batista, F.D. and Neuberger, M.S. (1998) *Immunity*, **8**, 751–759.
32. Cauerhff, A., Goldbaum, F.A., and Braden, B.C. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 3539–3544.
33. Ho, M., Kreitman, R.J., Onda, M., and Pastan, I. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 607–617.
34. Thorpe, I.F. and Brooks, C.L., 3rd (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 8821–8826.
35. Davies, D.R. and Padlan, E.A. (1992) *Curr. Biol.*, **2**, 254–256.
36. Braden, B.C. and Poljak, R.J. (1995) *FASEB J.*, **9**, 9–16.
37. Acierno, J.P., Braden, B.C., Klinke, S., Goldbaum, F.A., and Cauerhff, A. (2007) *J. Mol. Biol.*, **374**, 130–146.
38. Jung, S., Spinelli, S., Schimmele, B., Honegger, A., Pugliese, L., Cambillau, C., and Pluckthun, A. (2001) *J. Mol. Biol.*, **309**, 701–716.
39. Li, Y., Li, H., Yang, F., Smith-Gill, S.J., and Mariuzza, R.A. (2003) *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 482–488.
40. Sundberg, E.J., Urrutia, M., Braden, B.C., Isern, J., Tsuchiya, D., Fields, B.A., Malchiodi, E.L., Tormo, J., Schwarz, F.P., and Mariuzza, R.A. (2000) *Biochemistry*, **39**, 15375–15387.
41. Masuda, K., Sakamoto, K., Kojima, M., Aburatani, T., Ueda, T., and Ueda, H. (2006) *FEBS J.*, **273**, 2184–2194.
42. Wedemayer, G.J., Patten, P.A., Wang, L.H., Schultz, P.G., and Stevens, R.C. (1997) *Science*, **276**, 1665–1669.
43. Barta, A.H. and Hirshaut, Y. (1987) *Methods of hybridoma formation: Humana Press*.
44. Engvall, E. and Perlmann, P. (1971) *Immunochemistry*, **8**, 871–874.

45. Van Weeman, B. and Schuurs, A. (1971) FEBS Lett., **15**, 232–235.
46. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 4350–4354.
47. Katrukha, A.G., Bereznikova, A.V., Esakova, T.V., Pettersson, K., Lovgren, T., Severina, M.E., Pulkki, K., Vuopio-Pulkki, L.M., and Gusev, N.B. (1997) Clin. Chem., **43**, 1379–1385.
48. Katrukha, A., Bereznikova, A., Filatov, V., and Esakova, T. (1999) Clin. Chem. Lab. Med., **37**, 1091–1095.
49. Katrukha, A., Bereznikova, A., and Pettersson, K. (1999) Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl., **230**, 124–127.
50. Koshkina, E.V., Krasnosel'skii, M., Fedorovskii, N.M., Goriacheva, E.V., Polupan, A.A., Aref'ev, A.A., and Katrukha, A.G. (2009) Anesteziol. Reanimatol., 42–46.
51. Adams, J.E., 3rd, Bodor, G.S., Davila-Roman, V.G., Delmez, J.A., Apple, F.S., Ladenson, J.H., and Jaffe, A.S. (1993) Circulation, **88**, 101–106.
52. Feng, Y.J., Chen, C., Fallon, J.T., Lai, T., Chen, L., Knibbs, D.R., Waters, D.D., and Wu, A.H. (1998) Am. J. Clin. Pathol., **110**, 70–77.
53. Vaidya, H.C. (1994) J. Clin. Immunology, **17**, 35–39.
54. Katrukha, A.G., Bereznikova, A.V., Filatov, V.L., Esakova, T.V., Kolosova, O.V., Pettersson, K., Lovgren, T., Bulargina, T.V., Trifonov, I.R., Gratsiansky, N.A., Pulkki, K., Voipio-Pulkki, L.M., and Gusev, N.B. (1998) Clin. Chem., **44**, 2433–2440.
55. Filatov, V.L., Katrukha, A.G., Bereznikova, A.V., Esakova, T.V., Bulargina, T.V., Kolosova, O.V., Severin, E.S., and Gusev, N.B. (1998) Biochem. Mol. Biol. Int., **45**, 1179–1187.
56. Semenov, A.G., Postnikov, A.B., Tamm, N.N., Seferian, K.R., Karpova, N.S., Bloshchitsyna, M.N., Koshkina, E.V., Krasnoselsky, M.I., Serebryanaya, D.V., and Katrukha, A.G. (2009) Clin. Chem., **55**, 489–498.
57. Krishnamurti, U. and Steffes, M.W. (2001) Clin. Chem., **47**, 1157–1165.
58. Clark, P.M. (1999) Ann. Clin. Biochem., **36** (Pt 5), 541–564.
59. Ludwig, J.A. and Weinstein, J.N. (2005) Nat. Rev. Cancer, **5**, 845–856.
60. Arthur, J.M., Janech, M.G., Varghese, S.A., Almeida, J.S., and Powell, T.B. (2008) Contrib. Nephrol., **160**, 53–64.
61. Nakamura, R.M. and Binder, W.L. (1988) Arch. Pathol. Lab. Med., **112**, 869–877.
62. Ekins, R. (1992) Clin. Chem., **38**, 1289–1293.
63. Shivaraj, G., Prakash, B.D., Sonal, V., Shruthi, K., Vinayak, H., and Avinash, M. (2009) Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci., **13**, 341–349.
64. Cummings, M.C., Lukehart, S.A., Marra, C., Smith, B.L., Shaffer, J., Demeo, L.R., Castro, C., and McCormack, W.M. (1996) Sex. Transm. Dis., **23**, 366–369.
65. Stamm, W.E., Cole, B., Fennell, C., Bonin, P., Armstrong, A.S., Herrmann, J.E., and Holmes, K.K. (1984) J. Clin. Microbiol., **19**, 399–403.
66. Black, C.M. (1997) Clin. Microbiol. Rev., **10**, 160–184.
67. Safford, J.W., Abbott, G.G., Craine, M.C., and MacDonald, R.G. (1991) J. Clin. Pathol., **44**, 238–242.
68. Malomgre, W. and Neumeister, B. (2009) Anal. Bioanal. Chem., **393**, 1443–1451.
69. Cole, L.A. (2009) Expert Rev. Mol. Diagn., **9**, 721–747.
70. Andrew, S.M. and Titus, J.A. (2001) Curr. Protoc. Immunol., Unit 2.8. DOI: 10.1002/0471142735.im0208s21, Online Posting Date: 2001.
71. Hust, M., Jostock, T., Menzel, C., Voedisch, B., Mohr, A., Brenneis, M., Kirsch, M.I., Meier, D., and Dubel, S. (2007) BMC Biotechnol., **7**, 14.

72. Nieba, L., Honegger, A., Krebber, C., and Pluckthun, A. (1997) *Protein Eng.*, **10**, 435–444.
73. Whitlow, M., Bell, B.A., Feng, S.L., Filpula, D., Hardman, K.D., Hubert, S.L., Rollence, M.L., Wood, J.F., Schott, M.E., Milenic, D.E., and *et al.* (1993) *Protein Eng.*, **6**, 989–995.
74. Jain, M., Kamal, N., and Batra, S.K. (2007) *Trends Biotechnol.*, **25**, 307–316.
75. Wark, K.L. and Hudson, P.J. (2006) *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **58**, 657–670.
76. Chowdhury, P.S. and Vasmatazis, G. (2003) *Methods Mol. Biol.*, **207**, 237–254.
77. Conrad, U. and Scheller, J. (2005) *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, **8**, 117–126.
78. Borrebaeck, C.A., Malmborg, A.C., Furebring, C., Michaelsson, A., Ward, S., Danielsson, L., and Ohlin, M. (1992) *Biotechnology. (N. Y.)*, **10**, 697–698.
79. Telleman, P. and Junghans, R.P. (2000) *Immunology*, **100**, 245–251.
80. Lo, B.K.C., ed. *Antibody engineering. Methods and protocols*. 2004, Humana Press.
81. Benhar, I. and Pastan, I. (1994) *Protein Eng.*, **7**, 1509–1515.
82. Tachibana, H., Cheng, X.J., Watanabe, K., Takekoshi, M., Maeda, F., Aotsuka, S., Kaneda, Y., Takeuchi, T., and Ihara, S. (1999) *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **6**, 383–387.
83. Tachibana, H., Takekoshi, M., Cheng, X.J., Maeda, F., Aotsuka, S., and Ihara, S. (1999) *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **60**, 35–40.
84. Wlad, H., Ballagi, A., Bouakaz, L., Gu, Z., and Janson, J.C. (2001) *Protein Expr. Purif.*, **22**, 325–329.
85. Saviranta, P., Haavisto, T., Rappu, P., Karp, M., and Lovgren, T. (1998) *Bioconjug. Chem.*, **9**, 725–735.
86. Presta, L.G. (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.*, **116**, 731–736; quiz 737.
87. Smith, G.P. (1985) *Science*, **228**, 1315–1317.
88. Hanes, J. and Pluckthun, A. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4937–4942.
89. Liu, R., Barrick, J., Szostak, J.W., and Roberts, R.W. (2000) *Methods Enzymol.*, **1**, 268–293.
90. Daugherty, P.S., Chen, G., Olsen, M.J., Iverson, B.L., and Georgiou, G. (1998) *Protein Eng.*, **11**, 825–832.
91. Georgiou, G., Stathopoulos, C., Daugherty, P.S., Nayak, A.R., Iverson, B.L., and Curtiss, R., 3rd (1997) *Nat. Biotechnol.*, **15**, 29–34.
92. Boder, E.T., Midelfort, K.S., and Wittrup, K.D. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10701–10705.
93. Boder, E.T. and Wittrup, K.D. (1998) *Biotechnol. Prog.*, **14**, 55–62.
94. Boder, E.T. and Wittrup, K.D. (1997) *Nat. Biotechnol.*, **15**, 553–557.
95. Siegel, R.W. (2009) *Methods Mol. Biol.*, **504**, 351–383.
96. Vaughan, T.J., Williams, A.J., Pritchard, K., Osbourn, J.K., Pope, A.R., Earnshaw, J.C., McCafferty, J., Hoddits, R.A., Wilton, J., and Johnson, K.S. (1996) *Nat. Biotechnol.*, **14**, 309–314.
97. Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellenhofer, G., Hoess, A., Wolle, J., Pluckthun, A., and Virnekas, B. (2000) *J. Mol. Biol.*, **296**, 57–86.
98. Luginbuhl, B., Kanyo, Z., Jones, R.M., Fletterick, R.J., Prusiner, S.B., Cohen, F.E., Williamson, R.A., Burton, D.R., and Pluckthun, A. (2006) *J. Mol. Biol.*, **363**, 75–97.
99. Krebber, A., Bornhauser, S., Burmester, J., Honegger, A., Willuda, J., Bosshard, H.R., and Pluckthun, A. (1997) *J. Immunol. Methods*, **201**, 35–55.

100. Tabuchi, I., Soramoto, S., Nemoto, N., and Husimi, Y. (2001) FEBS Lett., **508**, 309–312.
101. Matsuura, T. and Yomo, T. (2006) J. Biosci. Bioeng., **101**, 449–456.
102. Pluckthun, A., Schaffitzel, C., Hanes, J., and Jermutus, L. (2000) Adv. Protein Chem., **55**, 367–403.
103. Ulrich, H.D., Patten, P.A., Yang, P.L., Romesberg, F.E., and Schultz, P.G. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **92**, 11907–11911.
104. Levin, A.M. and Weiss, G.A. (2006) Mol. Biosyst., **2**, 49–57.
105. Hawkins, R.E., Russell, S.J., and Winter, G. (1992) J Mol Biol, **226**, 889–896.
106. Yang, W.P., Green, K., Pinz-Sweeney, S., Briones, A.T., Burton, D.R., and Barbas, C.F., 3rd (1995) J. Mol. Biol., **254**, 392–403.
107. Verma, R., Boleti, E., and George, A.J. (1998) J. Immunol. Methods, **216**, 165–181.
108. Dimitrov, D.S. and Marks, J.D. (2009) Methods Mol. Biol., **525**, 1–27, xiii.
109. Dubel, S. (2007) Appl. Microbiol. Biotechnol., **74**, 723–729.
110. Groner, B., Hartmann, C., and Wels, W. (2004) Curr Mol Med, **4**, 539–547.
111. Stemmer, W.P.C. (1995) Nat. Biotechnol., **13**, 549–553.
112. Lippow, S.M., Wittrup, K.D., and Tidor, B. (2007) Nat. Biotechnol., **25**, 1171–1176.
113. Crameri, A., Raillard, S.A., Bermudez, E., and Stemmer, W.P. (1998) Nature, **391**, 288–291.
114. Stemmer, W.P. (1994) Nature, **370**, 389–391.
115. Chodorge, M., Fourage, L., Ravot, G., Jermutus, L., and Minter, R. (2008) Protein Eng. Des. Sel., **21**, 343–351.
116. Cline, J., Braman, J.C., and Hogrefe, H.H. (1996) Nucleic Acids Res., **24**, 3546–3551.
117. Hoogenboom, H.R. and Chames, P. (2000) Immunol. Today, **21**, 371–378.
118. Martineau, P. (2002) Methods Mol. Biol., **178**, 287–294.
119. Schlapschy, M., Gruber, H., Gresch, O., Schafer, C., Renner, C., Pfreundschuh, M., and Skerra, A. (2004) Protein Eng. Des. Sel., **17**, 847–860.
120. Fujii, I. (2004) Methods Mol. Biol., **248**, 345–359.
121. Zahnd, C., Spinelli, S., Luginbuhl, B., Amstutz, P., Cambillau, C., and Pluckthun, A. (2004) J. Biol. Chem., **279**, 18870–18877.
122. Low, N.M., Holliger, P.H., and Winter, G. (1996) J. Mol. Biol., **260**, 359–368.
123. Greener, A., Callahan, M., and Jerpseth, B. (1996) Methods Mol. Biol., **57**, 375–385.
124. Irving, R.A., Kortt, A.A., and Hudson, P.J. (1996) Immunotechnology, **2**, 127–143.
125. Lantto, J., Jirholt, P., Barrios, Y., and Ohlin, M. (2002) Methods Mol. Biol., **178**, 303–316.
126. Бикбулатова С.М., Мингазетдинова С.Р., Чемерис А.В., Вахитов В.А. (2009) Успехи современной биологии, **129**, 323–335.
127. Pogulis, R.J., Vallejo, A.N., and Pease, L.R. (1996) Methods Mol. Biol., **57**, 167–176.
128. Zhao, H., Giver, L., Shao, Z., Affholter, J.A., and Arnold, F.H. (1998) Nat. Biotechnol., **16**, 258–261.
129. Sivasubramanian, A., Sircar, A., Chaudhury, S., and Gray, J.J. (2009) Proteins, **74**, 497–514.
130. Barderas, R., Desmet, J., Timmerman, P., Meloen, R., and Casal, J.I. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **105**, 9029–9034.

131. *Essen, L.O. and Skerra, A.* (1994) *J. Mol. Biol.*, **238**, 226–244.
132. *Schiweck, W. and Skerra, A.* (1995) *Proteins*, **23**, 561–565.
133. *Marvin, J.S. and Zhu, Z.* (2005) *Drug Design Reviews – Online*, **2**, 419–425.
134. *Teng, S., Michonova-Alexova, E., and Alexov, E.* (2008) *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **9**, 123–133.
135. *Yue, P., Li, Z., and Moul, J.* (2005) *J. Mol. Biol.*, **353**, 459–473.
136. *Ng, P.C. and Henikoff, S.* (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3812–3814.
137. *Раменский В. и Сюняев Ш.* (2009) *Молекулярная биология*, **43**, 286–294.
138. *Sunyaev, S., Ramensky, V., and Bork, P.* (2000) *Trends Genet.*, **16**, 198–200.
139. *Sunyaev, S., Ramensky, V., Koch, I., Lathe, W., 3rd, Kondrashov, A.S., and Bork, P.* (2001) *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 591–597.
140. *Ramensky, V., Bork, P., and Sunyaev, S.* (2002) *Nucleic Acids Res.*, **30**, 3894–3900.
141. *Bromberg, Y. and Rost, B.* (2007) *Nucleic Acids Res.*, **35**, 3823–3835.
142. *Schymkowitz, J.W., Rousseau, F., Martins, I.C., Ferkinghoff-Borg, J., Stricher, F., and Serrano, L.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 10147–10152.
143. *Teng, S., Madej, T., Panchenko, A., and Alexov, E.* (2009) *Biophys. J.*, **96**, 2178–2188.
144. *Brooks, B.R., Brucoleri, R.E., Olafson, B.D., States, D.J., Swaminathan, S., and Karplus, M.* (1983) *Journal of Computational Chemistry*, **4**, 187–217.
145. *Boas, F.E. and Harbury, P.B.* (2008) *J. Mol. Biol.*, **380**, 415–424.
146. *Reumers, J., Schymkowitz, J., Ferkinghoff-Borg, J., Stricher, F., Serrano, L., and Rousseau, F.* (2005) *Nucleic Acids Res.*, **33**, D527–532.
147. *Karchin, R., Diekhans, M., Kelly, L., Thomas, D.J., Pieper, U., Eswar, N., Haussler, D., and Sali, A.* (2005) *Bioinformatics*, **21**, 2814–2820.
148. *Capriotti, E., Fariselli, P., and Casadio, R.* (2005) *Nucleic Acids Res.*, **33**, W306–310.
149. *Dehouck, Y., Grosfils, A., Folch, B., Gilis, D., Bogaerts, P., and Rooman, M.* (2009) *Bioinformatics*, **25**, 2537–2543.
150. *Lefranc, M.P., Pommie, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V., and Lefranc, G.* (2003) *Dev. Comp. Immunol.*, **27**, 55–77.
151. *Chowdhury, P.S.* (2002) *Methods Mol. Biol.*, **178**, 269–285.
152. *Yau, K.Y., Dubuc, G., Li, S., Hiram, T., Mackenzie, C.R., Jeremius, L., Hall, J.C., and Tanha, J.* (2005) *J. Immunol. Methods*, **297**, 213–224.
153. *Chowdhury, P.S. and Pastan, I.* (1999) *Nat. Biotechnol.*, **17**, 568–572.
154. *Marvin, J.S. and Lowman, H.B.* (2003) *Biochemistry*, **42**, 7077–7083.
155. *Selzer, T., Albeck, S., and Schreiber, G.* (2000) *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 537–541.
156. *Чугунов А.* (2007) URL: <http://biomolecula.ru/content/189>.
157. *Чугунов А.* (2008) URL: <http://biomolecula.ru/content/264>.
158. *Guo, J.T., Ellrott, K., and Xu, Y.* (2008) *Methods Mol. Biol.*, **413**, 3–42.
159. *Xu, J., Jiao, F., and Yu, L.* (2008) *Methods Mol. Biol.*, **413**, 91–121.
160. *Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M.A., Madhusudhan, M.S., Eramian, D., Shen, M.Y., Pieper, U., and Sali, A.* (2007) *Current Protocols in Protein Science*, Published online 2007 in Wiley InterScience, unit 2.9.1–2.9.31, DOI: 10.1002/0471140864.ps0209s50.

161. Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., and Peitsch, M.C. (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3381–3385.
162. Zhang, Y. (2008) *BMC Bioinformatics*, **9**, 40.
163. Bates, P.A., Kelley, L.A., MacCallum, R.M., and Sternberg, M.J. (2001) *Proteins*, **Suppl. 5**, 39–46.
164. Lambert, C., Leonard, N., De Bolle, X., and Depiereux, E. (2002) *Bioinformatics*, **18**, 1250–1256.
165. Kelley, L.A. and Sternberg, M.J. (2009) *Nat. Protoc.*, **4**, 363–371.
166. Lund, O., Frimand, K., Gorodkin, J., Bohr, H., Bohr, J., Hansen, J., and Brunak, S. (1997) *Protein Eng.*, **10**, 1241–1248.
167. Qian, B., Raman, S., Das, R., Bradley, P., McCoy, A.J., Read, R.J., and Baker, D. (2007) *Nature*, **450**, 259–264.
168. Zhang, Y. and Skolnick, J. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 7594–7599.
169. Martin, A.C.R. and Allen, J., *Bioinformatics Tools for Antibody Engineering*, in *Handbook of Therapeutic Antibodies*. 2007.
170. Wu, T.T. and Kabat, E.A. (1970) *J. Exp. Med.*, **132**, 211–250.
171. Al-Lazikani, B., Lesk, A.M., and Chothia, C. (1997) *J. Mol. Biol.*, **273**, 927–948.
172. Chothia, C. and Lesk, A.M. (1987) *J. Mol. Biol.*, **196**, 901–917.
173. Chothia, C., Lesk, A.M., Tramontano, A., Levitt, M., Smith-Gill, S.J., Air, G., Sheriff, S., Padlan, E.A., Davies, D., and Tulip, W.R. (1989) *Nature*, **342**, 877–883.
174. Martin, A.C., Cheetham, J.C., and Rees, A.R. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 9268–9272.
175. Honegger, A. and Pluckthun, A. (2001) *J. Mol. Biol.*, **309**, 657–670.
176. MacCallum, R.M., Martin, A.C., and Thornton, J.M. (1996) *J. Mol. Biol.*, **262**, 732–745.
177. Brucoleri, R.E. (2000) *Methods Mol. Biol.*, **143**, 247–264.
178. Martin, A.C., Cheetham, J.C., and Rees, A.R. (1991) *Methods Enzymol.*, **203**, 121–153.
179. Whitelegg, N.R. and Rees, A.R. (2000) *Protein Eng.*, **13**, 819–824.
180. Whitelegg, N. and Rees, A.R. (2004) *Methods Mol. Biol.*, **248**, 51–91.
181. Marcatili, P., Rosi, A., and Tramontano, A. (2008) *Bioinformatics*, **24**, 1953–1954.
182. Sircar, A., Kim, E.T., and Gray, J.J. (2009) *Nucleic Acids Res.*, **37**, W474–479.
183. Wiehe, K., Peterson, M.W., Pierce, B., Mintseris, J., and Weng, Z. (2008) *Methods Mol. Biol.*, **413**, 283–314.
184. Comeau, S.R., Gatchell, D.W., Vajda, S., and Camacho, C.J. (2004) *Bioinformatics*, **20**, 45–50.
185. Sternberg, M.J., Gabb, H.A., Jackson, R.M., and Moont, G. (2000) *Methods Mol. Biol.*, **143**, 399–415.
186. Chaudhury, S. and Gray, J.J. (2008) *J. Mol. Biol.*, **381**, 1068–1087.
187. Goodsell, D.S., Morris, G.M., and Olson, A.J. (1996) *J. Mol. Recognit.*, **9**, 1–5.
188. Ewing, T.J., Makino, S., Skillman, A.G., and Kuntz, I.D. (2001) *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **15**, 411–428.
189. Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T., and Klebe, G. (1996) *J. Mol. Biol.*, **261**, 470–489.
190. Halgren, T.A., Murphy, R.B., Friesner, R.A., Beard, H.S., Frye, L.L., Polard, W.T., and Banks, J.L. (2004) *J. Med. Chem.*, **47**, 1750–1759.
191. Verdonk, M.L., Cole, J.C., Hartshorn, M.J., Murray, C.W., and Taylor, R.D. (2003) *Proteins*, **52**, 609–623.
192. Dominguez, C., Boelens, R., and Bonvin, A.M. (2003) *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 1731–1737.

193. Totrov, M. and Abagyan, R. (1997) Proteins, **Suppl. 1**, 215–220.
194. Wriggers, W. and Birnmanns, S. (2001) J. Struct. Biol., **133**, 193–202.
195. Sousa, S.F., Fernandes, P.A., and Ramos, M.J. (2006) Proteins, **65**, 15–26.
196. Skerra, A. (2000) J. Mol. Recognit., **13**, 167–187.
197. Sidhu, S.S., Li, B., Chen, Y., Fellouse, F.A., Eigenbrot, C., and Fuh, G. (2004) J. Mol. Biol., **338**, 299–310.
198. Bostrom, J., Lee, C.V., Haber, L., and Fuh, G. (2009) Methods Mol. Biol., **525**, 353–376, xiii.
199. Lee, C.V., Liang, W.C., Dennis, M.S., Eigenbrot, C., Sidhu, S.S., and Fuh, G. (2004) J. Mol. Biol., **340**, 1073–1093.
200. Rajpal, A., Beyaz, N., Haber, L., Cappuccilli, G., Yee, H., Bhatt, R.R., Takeuchi, T., Lerner, R.A., and Crea, R. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **102**, 8466–8471.
201. Schier, R., Balint, R.F., McCall, A., Apell, G., Larrick, J.W., and Marks, J.D. (1996) Gene, **169**, 147–155.
202. Brorson, K., Thompson, C., Wei, G., Krasnokutsky, M., and Stein, K.E. (1999) J. Immunol., **163**, 6694–6701.
203. Jackson, T., Morris, B.A., Martin, A.C., Lewis, D.F., and Sanders, P.G. (1992) Protein Eng., **5**, 343–350.
204. Clark, L.A., Boriack-Sjodin, P.A., Eldredge, J., Fitch, C., Friedman, B., Hanf, K.J., Jarpe, M., Liparoto, S.F., Li, Y., Lugovskoy, A., Miller, S., Rushe, M., Sherman, W., Simon, K., and Van Vlijmen, H. (2006) Protein Sci., **15**, 949–960.
205. Liu, Y. and Kuhlman, B. (2006) Nucleic Acids Res., **34**, W235–238.
206. Yuan, L., Kurek, I., English, J., and Keenan, R. (2005) Microbiol. Mol. Biol. Rev., **69**, 373–392.
207. Wells, J.A. (1990) Biochemistry, **29**, 8509–8517.
208. Riechmann, L. and Weill, M. (1993) Biochemistry, **32**, 8848–8855.
209. Foote, J. and Winter, G. (1992) J. Mol. Biol., **224**, 487–499.
210. Schier, R., McCall, A., Adams, G.P., Marshall, K.W., Merritt, H., Yim, M., Crawford, R.S., Weiner, L.M., Marks, C., and Marks, J.D. (1996) J. Mol. Biol., **263**, 551–567.
211. Chen, C., Roberts, V.A., and Rittenberg, M.B. (1992) J. Exp. Med., **176**, 855–866.
212. Gustchina, E., Louis, J.M., Frisch, C., Ylera, F., Lechner, A., Bewley, C.A., and Clore, G.M. (2009) Virology, **393**, 112–119.
213. Hanes, J., Schaffitzel, C., Knappik, A., and Pluckthun, A. (2000) Nat. Biotechnol., **18**, 1287–1292.