Успехи биологической химии, т. 62, 2022, с. 319-368

Памяти Льва Павловича Овчинникова, моего дорогого Учителя, Наставника и Друга.

БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ: ДОСТИЖЕНИЯ ФАГОВОГО ДИСПЛЕЯ В НАУКЕ И МЕДИЦИНЕ

©2022 г.

Е. К. ДАВЫДОВА

Чикагский Университет, кафедра биохимии и молекулярной биологии, Чикаго, Иллинойс 60637, США

I. Введение. II. Фаговый дисплей антител. III. Дисплей-конвейер в КоссЛаб. IV. Синтетические антитела. V. Инженерные варианты белка G и остова Fab-молекулы. VI. Новая платформа для сменяемых Fab-молекул. VII. Заключение

І. ВВЕДЕНИЕ

«Мощь эволюции проявляется в разнообразии жизни» – этими словами начинается сообщение о присуждении Нобелевской премии по химии 2018 года трём учёным: Фрэнсис Х. Арнольд – за направленную эволюцию ферментов и Джорджу П. Смиту и Грегори П. Винтеру – за фаговый дисплей пептидов и белков. Благодаря открытиям этих выдающихся исследователей, теперь мы можем контролировать внеорганизменную эволюцию белков и использовать её результаты на благо человечества. Ферменты, полученные в результате направленной эволюции, используются в производстве множества продуктов: от биотоплива до фармацевтических препаратов, а антитела, полученные с помощью фагового дисплея, борются с

Принятые сокращения: КоссЛаб – лаборатория проф. А. А. Коссякова в Чикагском Университете; IgG – иммуноглобулин G; Fab – антиген-связывающий фрагмент, отщепляемый папаином; HC – тяжелая цепь; LC – легкая цепь; VH – вариабельный домен тяжелой цепи; VL – вариабельный домен легкой цепи; CL – константный домен легкой цепи; CDR – определяющая комплементарность область; Fc – кристаллизующийся фрагмент; ScFv – одноцепочечный вариабельный фрагмент; cAT – синтетические антитела; белок GA1 – инженерный вариант домена C2 белка G; BLF – комплементационный фрагмент β-лактамазы; BiTE – би-специфический рекрутёр Т-клеток; TCR – Т-клеточный рецептор.

Адрес для корреспонденции: edavydov@uchicago.edu

L. П. Дивоюови	Е.	К.	Давыдова
----------------	----	----	----------

аутоиммунными заболеваниями и побеждают рак [1]. Белковые структуры с улучшенными функциональными возможностями могут быть также полностью смоделированы на компьютере с помощью рационального молекулярного и *de novo* дизайна [2]. Более того, комбинация из компьютерного и эволюционного подходов часто даёт синергический эффект и производит варианты существенно превосходящие смоделированные [3]. Таким образом утвердилась Белковая Инженерия – мультидисциплинарная наука, основанная на химии, молекулярной биологии, науке о белке и компьютерных технологиях, использующая и дополняющая возможности Генной Инженерии, одного из крупнейших достижений Молекулярной Биологии в прошлом.

Традиционно термин «направленная эволюция» употребляется строго в отношении прорывной технологии. разработанной Арнольд [4-8], направленной на усовершенствование характеристик ферментов в процессе повторяющихся циклов мутационной диверсификации на генном уровне и последующего высокоэффективного скрининга закодированных вариантов на белковом уровне. Альтернативно, в случае фагового дисплея, разнообразие вводится однократно в исходной библиотеке, содержащей миллиарды белковых и пептидных вариантов, представленных на поверхности фаговых частиц, и затем подвергается экстремальному снижению в результате последовательных раундов обогащения и амплификации, что приводит к отбору ограниченного числа уникальных фаговых клонов. В обоих случаях амплификация подходящих молекулярных вариантов, отобранных на белковом уровне, требует наличия однозначной связи между генотипом и фенотипом, которая и обеспечивается в индивидуальной клетке или фаговой частице. При этом, как уже отмечалось, принципиальная разница в двух подходах заключается в том, что в случае фагового дисплея отсутствует дополнительная диверсификация ДНК в каждом цикле. Таким образом, в отличие от направленной эволюции, когда варианты молекул отбираются в результате многоступенчатого, постепенного и последовательного процесса улучшения требуемых свойств, молекулярная эволюция при использовании фагового дисплея заключается в многократном обогащении пула белков наиболее соответствующими критериям отбора вариантами, присутствующими в нём исходно, и скорее напоминает явление, называющееся в эволюции «эффектом бутылочного горлышка», спорадически случающееся в природе, нежели постепенное и постоянное эволюционирование. В силу использования молекулярного отбора, основанного на связывании белков с фаговой частицей, фаговый дисплей, в отличие от

направленной эволюции, не может быть применим для изменения и усовершенствования активности ферментов, и обычно используется для усиления структурной стабильности белка или его связывания с антигенами, белковыми партнёрами или лигандами.

Размах и возможности фагового дисплея радикально увеличились со времен публикаций основополагающих исследований Смита и Винтера в 1980-х [9–14]. Для фагового дисплея было сконструировано большое число пептидных и антительных библиотек, содержащих 10^{11–12} уникальных генотипов [15–22]. Синтетические антитела (сАТ), созданные для индивидуальных антигенов или антигенных эпитопов существенно облегчили решение белковых структур и дали толчок прорывным направлениям в медицине. Множественные модификации оригинальной технологии фагового дисплея, включая циклические и искусственно-сцепленные пептиды [23], позволили получить огромное разнообразие лигандов, пригодных для раковой диагностики и иммунотерапии [24].

Современный список антираковых и иммуномодулирующих терапевтических средств безусловно отражает прогресс белковой инженерии и помимо продукции новых действенных пептидных или синтетических лигандов и антител, оптимизированных in vitro. Такие качества, как высокоспецифическая адресность и контролируемый эффект на клетку-мишень определили широкое применение разнообразных производных антител, таких, как коньюгаты с лекарственными средствами и биспецифические молекулы. При этом тип клетки-мишени определяется конкретным клеточным рецептором на её поверхности, специфичностью к которому обладает данное антитело, а судьба клетки – привязанным к антителу эффекторным компонентом. Конъюгаты антител с цитотоксичными молекулами способны убивать раковые клетки, обеспечивая адресное попадание токсичного компонента в раковую клетку, узнаваемую антителом, связывающимся с онко-специфическим рецептором [25]. Цитолитический эффект би-специфических рекрутёров Т-клеток (BiTE), в свою очередь, зависит от их способности образовывать синапс между раковыми и Т-клетками посредством узнавания их рецепторов биспецифической молекулой [26-27]. Кроме того, были разработаны подобные же би-специфические препараты на основе антител, способные ингибировать воспалительные процессы и излечивать аутоиммунные заболевания и болезненные состояния, вызванные избыточным воспалением [28-29]. Десятки различных форматов лекарственных препаратов на основе антител были сконструированы к сегодняшнему дню, а новые постоянно появляются [30-31].

Е. К. Давыдова	Е.	К.	Давыдова
----------------	----	----	----------

В этом обзоре представлено детальное обсуждение технологии фагового дисплея – от дизайна и конструирования фаговых библиотек до методов характеристики сАТ. На примере производства сАТ в лаборатории профессора Коссякова (КоссЛаб) Чикагского Университета будут рассмотрены последние достижения в адаптации сАТ для решения структур трудно кристаллизуемых белков, белковых комплексов и мембранных белков, а также других специализированных задач, связанных со стабилизацией определённых конформационных состояний белков. Будут представлены данные об эффективности этих сАТ в качестве термодинамических зондов для оценки энергетических и функциональных состояний белка, кристаллизационных шаперонов и реперных маркеров для криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ). Также будет подробно рассмотрена созданная в КоссЛаб уникально взаимоспецифичная пара инженерных вариантов белка G (GA1) и структурного остова Fab-фрагмента (Fab^{LRT}), которая позволила разработать легко адаптируемую к разным задачам, мультифункциональную платформу на основе GA1 со сменяемым антительным Fab^{LRT} компонентом. Возможное применение этой платформы в науке, биотехнологии и медицине обсуждается в заключительной части обзора.

II. ФАГОВЫЙ ДИСПЛЕЙ АНТИТЕЛ

ФОРМАТЫ АНТИТЕЛ

Иммуноглобулины G (IgGs) – наиболее представленный тип антител в человеческом организме. В силу того, что IgGs являются сложными бивалентными мультисубъединичными белками со множественными дисульфидными связями (рис. 1), они не могут быть экспрессированы в бактериальной клетке для целей фагового дисплея. Поэтому для практических целей используются моно-валентные форматы антител, в основном, такие, как одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) и антигенсвязывающий фрагмент (Fab) [32]. Fab фрагмент представляет из себя гетеродимер, состоящий из полной легкой цепи (домены VL и CL) и фрагмента Fd тяжёлой цепи (домены VH и CH1), которые на С-концах обычно сцеплены дисульфидной связью (эта связь не является принципиально важной для гетеро-димеризации) [33]. Эти две цепи, приблизительно равные по массе, в сумме образуют Fab с массой ~50 кДа. scFv молекула приблизительно в два раза меньше (~25 кДа) и состоит из двух вариабельных доменов (VH и VL), соединённых друг с другом гибким пептидным линкером длиной ~15 a.o. Надо отметить, что Fab фрагменты обычно полностью сохраняют



Рис. 1. Форматы антител, используемые в технологии фагового дисплея.

А – Схематические структуры IgG антитела человека и его фрагментов: HC –тяжелая цепь; LC – легкая цепь; VH – вариабельный домен тяжелой цепи; VL – вариабельный домен легкой цепи; CH1–CH3 – константные домены тяжелой цепи, CL – константный домен легкой цепи; Fc – кристаллизующийся фрагмент; Fab – антиген-связывающий фрагмент, отщепляемый папаином; Fd – тяжёлая цепь Fab; CDR - определяющие комплементарность области в тяжелой цепи (H1 H2 H3) и в лёгкой цепи (L1 L2 L3); ScFv – одноцепочечный вариабельный фрагмент;

Б – Схематические структуры гомодимерного верблюжьего IgG и VHH нанотела.

Изображения сделаны с использованием Biorender (www.biorender.com).

свою антигенсвязывающую аффинность при переформатировании в IgG и обратно (с учётом в два раза большей валентности IgG), в то время, как аффинность scFv формата может драматически меняться при переформатировании, и иногда зависит от взаимной ориентации VH/VL доменов и/или длины линкера; другим недостатком scFv молекул является их предрасположенность к олигомеризации [34, 35].

В пионерский работах Винтера были использованы оба, scFV и Fab, формата антител [24, 36], которые и поныне остаются наиболее используемыми cAT в библиотеках для фагового дисплея. Однако, новые комбинационные форматы, такие как гетеродимеры VH-VL доменов [37], а также, нанотела, представляющие одиночные VHH домены из необычных гомодимерных IgG верблюдовых [38], начали успешно конкурировать с каноническими форматами фагового дисплея. Около десяти терапевтических антител, полученных с помощью фагового дисплея, были запущены в производство, включая наиболее успешное в мире антитело для лечения ревматоидного

Ε.	К.	Давыдова
Ŀ.	1.	дивоюови

артрита, адалимумаб [39], а многие другие находятся на разных стадиях разработки [40].

Помимо фагового, множество других вариантов дисплеев белков были разработаны для лучшего соответствия особым задачам и специальным условиям отбора. Гигантские библиотеки поверхностных рекомбинантных белков были созданы для дисплея на клетках бактерий, дрожжей, насекомых и млекопитающих [41-44]. Особым преимуществом клеток млекопитающих является эффективная экспрессии много-доменных белков и мульти-молекулярных комплексов, а также возможность синтеза функционально-активных белков, требующих обязательных посттрансляционых модификаций, осуществляющихся в цитоплазме эукариот [45]. Преимущества же альтернативных, бесклеточных методов, таких как рибосомный [46] или мРНК [47] дисплеи заключаются в их быстроте, большей масштабности библиотек, и возможном включении в белки ненатуральных аминокислот и химических модификаций. Однако, несмотря на всё перечисленное выше, фаговые частицы и сегодня остаются самой популярной платформой для дисплея белков.

БАКТЕРИОФАГ М13

Данный раздел будет посвящён анализу бактериофага M13, а именно хорошо известным, однако исключительно важным для понимания специфики, преимуществ и ограничений M13 фагового дисплея, аспектам его структуры и физиологии, и может быть проигнорирован продвинутым читателем.

М13, fd и f1П, F-пили-специфические, практически идентичные (идентичность 98% на уровне ДНК), филаментные бактериофаги, были первыми, использованными в фаговом дисплее [48]. Позднее, хвостатые бактериофаги, такие как Т4 и Т7 также были использованы для создания белковых библиотек [49]. Наиболее разработанный из них, дисплей на основе Т7 фага, имеет несколько определённых преимуществ перед классическим М13 дисплеем, которые могут быть важны в специальных случаях: фаг содержит двухцепочечную (дц) ДНК, которая имеет более высокую стабильность и в меньшей степени подвержена мутациям, по сравнению с одноцепочечной (оц) геномной ДНК фага М13; чужеродная комплементарная ДНК или генные библиотеки бактерий могут быть впрямую клонированы в дц геном фага T7; фаг T7 не зависит от секреторных механизмов бактериальной клетки, поскольку имеет литический жизненный цикл.

Тем не менее, другие преимущества фага М13 обеспечили наибольшее развитие и популярность М13 дисплея среди всех остальных

дисплейных платформ. Фаг М13 имеет высокую продуктивность репликации и, в качестве дц ДНК фагмидного вектора, имитирующего репликативную форму (РФ), способен вместить чужеродную ДНК большого размера, а оцДНК, синтезированная на матрице фагмидного вектора может быть упакована в инфекционные фаговые частицы. Фаг М13 не вызывает лизис клетки-хозяина: филаменты фагового потомства секретируются из целостной клетки (однако, скорость бактериального роста при этом несколько снижается). Как следствие, библиотеки фагового дисплея могут храниться в виде замороженных бактериальных культур. Кроме того, чрезвычайная устойчивость частиц фага М13 в широком диапазоне температур, рН, и в разнообразных по составу растворах позволяет проводить длительную инкубацию фаговых библиотек во время экспериментальных процедур и их долговременное хранение в замороженном и лиофилизированном виде [50].

Геном фага M13 представлен кольцевой молекулой оцДНК длиной 6400 нуклеотидов (нт), кодирующей 11 фагоспецифичных белков. Он защищен прочной белковой, состоящей из ~2700 копий белка оболочки, продукта гена 8 (pg8), образующих цилиндрическую структуру, и нескольких копий второстепенных белков оболочки, расположенных на концах фагового филамента: gp3 (пять копий) и gp6 – на одном, и pg7 и gp9 – на другом. Инфекционная фаговая частица имеет длину ~1 мкм и диаметр ~7 нм [51].

Первый шаг в инфекционном цикле фага М13 заключается в узнавании gp3 F-пилей на поверхности Escherichia coli, с последующим связыванием gp3 с tolA-содержащим бактериальным комплексом, который соединяет внешнюю и внутреннюю мембрану клеткихозяина [32]. После прохождения периплазматического пространства, геномная М13 оцДНК освобождается от белковой оболочки и попадает в цитоплазму, где с помощью бактериальных ферментов быстро преобразовывается в дц РФ ДНК. Далее инициируется транскрипция с пяти конститутивных промоторов, приводящая к синтезу матричных (м)РНК, кодирующих все 11 фаговых белков. Параллельно, РФ ДНК используется как матрица в репликации по типу катящегося кольца для синтеза сотен оц копий M13 генома, некоторая часть которых вновь преобразуется в РФ ДНК. Большинство же предназначается для упаковки в фаговое потомство. По мере того, как происходит накопление вновь синтезированных фаговых белков, ~750 димеров gp5 кооперативно связываются по всей длине геномной оцДНК фага, за исключением небольшого участка длиной 77 нт, известного как сигнал упаковки. Таким образом оболочка из gp5 собирает геномную

Ε.	К.	Давыдова
----	----	----------

ДНК в гибкую палочку, защищенную от нуклеаз – внутриклеточный предшественник вириона. Выход фагового потомства из клетки начинается со взаимодействия сигнала упаковки на переднем конце предшественника (на том конце, с которого начинается сборка) со сборочным белковым комплексом (включающим gp1, gp11, и возможно, некоторые бактериальные белки), расположенным на внутренней мембране. Затем ассоциированные с мембраной олигомеры gp8 складываются в спиральную структуру вокруг фаговой ДНК, замещая при этом gp5. Образующийся при этом фаговый филамент проходит через пронизывающий периплазму канал и порино-подобную структуру из 14 субъединиц gp4. На последнем этапе сборки находящиеся на внутренней мембране gp3 и gp6 прикрепляются к проксимальному окончанию фага, готового теперь к следующему инфекционному циклу.

Особенности репликации и сборки фага М13 отражены в конструкции вектора для дисплея чужеродных полипептидов в качестве гибридов с белками оболочки фага. Как правило, требуемый ген присоединяется к одному из белков оболочки, клонированному в плазмиду, которая содержит обе точки репликации (для дцДНК плазмиды и f1 для оцДНК), сигнал упаковки М13 и ген устойчивости к антибиотику [52]. Такой вектор, называемый фагмидой, может быть трасформирован в E. coli и амплифицирован как обычная плазмида. Поскольку фагмида имитирует РФ ДНК фага, трансформированные фагмидой клетки могут эффективно синтезировать множество копий оц фагмиды и упаковать их в инфекционные частицы при помощи суперинфекции хелперным M13 фагом (для этого трансформированные фагмидой клетки должны нести на своей поверхности F-пили). При этом хелперный фаг содержит мутацию в сигнале упаковки ДНК, затрудняющую сборку фаговой частицы, из-за чего происходит преимущественная сборка частиц, содержащих фагмидную ДНК с немутантным сигналом упаковки. Такие вирионы имеют на поверхности закодированный в фагмиде гибридный белок, что обеспечивает сцепление генотипа и фенотипа фага, - основополагающий принцип, делающий возможной молекулярную эволюцию посредством фагового дисплея. Для упрощения этой системы были сконструированы специальные бактериальные «упаковочные клетки», содержащие М13 плазмиду, лишенную сигнала упаковки, что снимает необходимость суперинфекции хелперным фагом и предотвращает загрязнения им фагмиды [54]; однако, стандартный метод, с использованием хелперного фага, до сих пор наиболее популярен.

Каждый белок оболочки фага М13 был использован для молекулярного дисплея к настоящему времени [55]. При создании гибридного белка, должны быть учтены такие детали, как своеобразие конкретного белка оболочки, а также и структурные особенности белка, выбранного для дисплея. Как уже отмечалось выше, крупные, сложно устроенные и много-субъединичные белки, как правило, не подходят для экспрессии в бактериальных клетках и автоматически исключаются из кандидатов на фаговый дисплей. Кроме того, некоторые белки могут не включаться в капсид вириона, даже будучи успешно синтезированы бактерией. Это может происходить на разных стадиях сборки фаговой частицы. Такие препятствия, как стерические помехи, или несоответствующая поверхность белка, могут предотвратить включение в фаговый капсид некоторых массивных, или заряженных, или, наоборот, гидрофобных гибридных белков. Это может происходить уже на стадии ассоциации с мембраной, либо при узнавании комплексом сборки, либо после включения в капсид – на стадии выхода фага, из-за превышения размера просвета канала, образованного gp4, полностью собранным гибридным белком капсида. Так, gp8, использующийся для мультивалентного дисплея пептидов оказывается неподходящим даже для дисплея фрагментов антител, из-за их крупного размера. gp3 был исторически первым, и остаётся основным белком, используемым для дисплея scFv или Fab фрагментов [24, 36]. Для дисплея фрагменты антител могут быть присоединены как к N-концу gp3, ответственному за связывание F-пилями E. coli, так и к его C-концевому домену, который заякоривается в концевой структуре фага. При этом, встраивание гибридного белка на основе gp3 в капсид не влияет на способность фага инфицировать E. coli, поскольку негибридный gp3, закодированный в геноме хелперного фага, преимущественно синтезируется и включается в пентамерный gp3 комплекс фаговой частицы [56, 57]. Более того, даже не каждый капсид может содержать гибридный белок, что, впрочем, не является проблемой, поскольку стандартная фаговая библиотека в одном миллилитре имеет в 100 раз больше частиц, чем индивидуальных клонов.

БИБЛИОТЕКИ НАТУРАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Библиотеки антител могут быть натуральными или синтетическими, в зависимости от источника компонента их разнообразия. Для конструирования натуральных библиотек разнообразие берётся из репертуара антител, возникающего в живой иммунной системе в результате генных перестроек. Каждый из трёх главных локусов

Е. К. Давыдова

генов иммуноглобулинов человека (один, кодирующий НС, и два, лямбда и каппа, – LC), содержит множество V, D (только в случае HC) и J генных сегментов. V(D)J рекомбинация происходит по-разному в каждом индивидуальном лимфоците, приводя к последовательному присоединению одной случайно выбранной копии каждого типа сегмента друг к другу, что даёт гигантское потенциальное разнообразие HC последовательностей ~1011, и теоретически возможное разнообразие наивных библиотек в районе10¹⁶–10¹⁸ [58]. В составе цепей антител это разнообразие представлено, в основном, шестью определяющими комплементарность областями (CDR), представляющими собой гипервариабельные структурные петли, и подвергающимися клональному отбору в иммунной системе. Три из них, CDR L1, L2, и L3 находятся в VL, и ещё три: H1, H2, H3 – в VH. Поскольку CDR в VH более разнообразны (из-за наличия D сегментов), они чаще вовлекаются в узнавание антигена, чем CDR в VL. Вклад каждой из шести CDR областей в связывании антигена индивидуален в каждом случае, и аминокислотный остаток в одной и той же позиции одной и той же CDR области может играть разные роли в разных антигенных комплексах [59]. При этом H3 CDR отличается большей длиной и степенью структурного и композиционного разнообразия [60] и считается наиболее важным в узнавании антигена по сравнению с остальными пятью [61], обладающими небольшими варьирующими размерами (3-15 остатков) и ограниченным числом основных конформаций.

Природные комбинаторные библиотеки обычно создаются путём образования случайных пар VH-VL доменов из кДНК пула В-лимфоцитов млекопитающих в результате независимого клонирования вариабельных доменов в фагмидный вектор при помощи ПЦР. Проведение предварительной иммунизации требуемыми антигенами приводит к обогащению ассортимента антител с нужной специфичностью. Полученные в результате этого иммунные библиотеки могут быть существенно меньшего размера, по сравнению с наивными библиотеками, поскольку после иммунизации пул В-лимфоцитов содержит множество клонов, специфичных к использованному при иммунизации антигену. Некоторые наивные библиотеки имеют 10¹¹ и более уникальных клонов [18, 21, 22], приближаясь к практическому пределу для фаговых библиотек в 10¹², связанному с техническими ограничениями масштабов трансформации, культивирования и хранения бактериальных клеток [62]. В то время как теоретическое разнообразие наивных комбинаторных библиотек значительно больше, чем их практически достижимый размер, фак-

тическое разнообразие спаренных VH–VL участков в иммунной системе млекопитающих принципиально меньше. К примеру, использование миниатюрных фаговых библиотек, содержащих ~10⁶ природных пар VH–VL, полученных из кДНК индивидуальных В-лимфоцитов с помощью микрофлюидной технологии, позволяет выявить чрезвычайно редкие варианты природных антител, а также объединить природные паратопы от сотен доноров в одной библиотек доступны в настоящее время для дисплея антител в разнообразных форматах, включая такие, как куриные scFVs и VHH нанотела верблюжьих. Природные библиотеки являются прекрасным источником высококачественных антител для применения в медицине [65] или ветеринарии [66]. Большое количество подобных антител уже используются в этих целях или находятся на разных стадиях клинического исследования [40].

БИБЛИОТЕКИ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ

Большинство библиотек сАТ использует природный иммуноглобулиновый остов, однако, некоторое количество других молекул, представляющих собой белок-связывающие модули природного происхождения были использованы для преобразования нескольких диверсифицированных петель в компактную антигенсвязывающую структуру [67]. На основе этих модулей включенных в фаговые дисплеи, были получены высококачественные антигенсвязывающие молекулы, которые могут представлять большой интерес для научных исследований, поскольку они обладают прочной структурой, высокой растворимостью и малым размером. Несколько подобных антигенсвязывающих молекул не иммуноглобулиновой природы находятся в настоящее время на разных стадиях клинических исследований [68]. Тем не менее, несмотря на постоянный вызов со стороны новых форматов фагового дисплея, канонические библиотеки на основе фрагментов антител остаются наиболее востребованными для получения новых cAT [69].

Дизайн CDR областей для библиотеки синтетических антител должен включать многообразные по длине и составу последовательности, но напоминающие природные CDR [70]. Как уже обсуждалось, разнообразие CDR для натуральных библиотек создаётся в функционирующей иммунной системе [12], поэтому качество натуральной библиотеки, в основном, зависит от эффективности включения этого разнообразия в библиотеку, т.е. её размера. В отличие от этого теоретическое разнообразие синтетических CDR практически не

E.	К.	Давыдова
----	----	----------

ограничено: к примеру, при полной рандомизации короткой последовательности всего лишь из семи кодонов возникнет больше разнообразных вариантов, чем может быть включено в библиотеку, содержащую 10¹² клонов. Таким образом, строгая диверсификационная стратегия, предусматривающая оптимальные метод и масштаб рандомизации кодонов и разнообразие длин каждой из шести CDR областей, является наиболее важной составляющей дизайна высококачественных сАТ библиотек [69].

Изначально, для получения случайных последовательностей CDR областей для сАТ-библиотек синтезировали вырожденные олигонуклеотидные последовательности различной длины, используя нуклеотидные смеси разных составов [71]. Из-за вырожденности генетического кода при синтезе олигонуклеотидов можно использовать смешанные кодоны. Например, кодоны NNK или NNS (где N – любой из четырех нуклеотидов; K = G или T; S = G или C) кодируют все 20 аминокислот, элиминируют два из трёх стоп кодонов (TGA и ТАА, но не ТАG) и уменьшают общее число кодонов с 64-х до 32-х. Таким образом, количество уникальных ДНК последовательностей снижается вдвое. Использование других более ограниченных комбинаций нуклеотидов приводит к дальнейшему уменьшению разнообразия кодонов и закодированных аминокислот. Примеры часто используемых смешанных кодонов для дизайна CDR включают KMT (M = A или C), кодирующий Ala, Asp, Ser или Tyr; WMC (W = A или T) – Asn, Ser, Thr, или Tyr; и RRT (R = A или G) – Asn, Asp, Gly, or Ser. Вырожденные олигонуклеотиды синтезировать легко и недорого, этим методом были получены высокопроизводительные сАТ библиотеки, насчитывающие 10⁸–10⁹ уникальных клонов [72]. Из-за ограничения размера библиотек кажется предпочтительным использование меньших наборов кодонов, однако, в них могут быть взаимоисключающие или ненужные аминокислоты.

Эта проблема была разрешена более затратными, но полностью кодон-специфичными методами синтеза, основанными на использовании тринуклеотид-фосфораимидитов [73], или дцДНК триплетов (Слономикс [74]). Как следствие, CDR последовательности могут иметь меньшее число вариантов, но с более разнообразным и естественным распределением аминокислотных остатков. Это одновременно улучшает и представленность клонов в библиотеке, и их сходство с природными антителами. Планирование размера библиотеки с учетом количества уникальных комбинаций CDR $\leq 10^{11}$, может значительно улучшить покрытие вариантов фагового дисплея и глубину их выборки.

Как упоминалось выше, теоретический размер библиотеки зависит от её дизайна - от того, какое количество CDR используется, а также от диапазона длин CDR-петель, и количества и качества привносимого разнообразия в каждой позиции каждой петли. Следуя природной тенденции, предпочтительно варьирующей CDR L3 и H3 из-за их большей вовлеченности в узнавание антигена, было сконструировано много качественных сАТ библиотек с разнообразием, внесённым только в L3 и H3, и с лишь одним из канонических природных вариантов в других четырёх CDR [73, 75, 76]. Вместе с тем были созданы объёмные и высокоэффективные библиотеки, в которых разнообразие было представлено всеми шестью CDR областями [72, 78, 79]. Может показаться неожиданным, но довольно продуктивными оказались даже минималистические библиотеки, содержащие остатки лишь двух аминокислот, Туг и Ser, в составе своих CDR областей. На их основе были получены высоко специфические антитела к широкому кругу антигенов, что, помимо прочего, объясняло высокую частоту встречаемости этих аминокислот в CDR антител из природного репертуара [77]. В силу несложности дизайна и своего меньшего теоретического разнообразия минималистические библиотеки отличаются простотой конструирования и высоким покрытием вариантов. Понятно, что чем более глубокое разнообразие вносится в большее количество CDR петель, затрагивая больше вариантов их длин и позиций, тем более композиционно-сложные, пространственно-развернутые и конформационно-многообразные паратопы могут быть запланированы в такой библиотеке. Теоретически это, безусловно, должно способствовать более эффективному распознаванию антигенов самых разных типов, но одновременно приводит к экспоненциальному росту числа возможных вариантов, и сильной «недопредставленности» клонов.

Как уже обсуждалось, природные антитела имеют существенное преимущество перед сАТ, поскольку представляют собой хорошо экспрессируемые и стабильные белки, успешно прошедшие через множественные контрольные механизмы живой иммунной системы. Кроме того, химический синтез CDR петель неотвратимо сопровождается ошибками, приводящими к самым разнообразным мутациям, таким как сдвиг рамки считывания, замена аминокислотного остатка и возникновение стоп-кодона [72, 77]. Для того, чтобы исключить непродуктивные клоны была предложена завершающая конструирование библиотек коррекционная селекция на ампициллин-устойчивость клонов сАТ-вариантов, генетически присоединённых к β-лактамазе [77].

Е.	К.	Давыдова
		/ /

Очевидно, что ещё одним важным аспектом, определяющим функциональность фагового дисплея с использованием сАТ является баланс между теоретически возможным числом вариантов, определяемым дизайном, и числом уникальных фаговых клонов, полученным при конструировании, т.е. степень представленности клонов. Недопредставленность некоторых вариантов в библиотеке может также быть вызвана и такими клон-специфическими затруднениями, как замедленная репликация и сборка, что может приводить к уменьшению пула, или полному исчезновению проблемного клона. Сильно диверсифицированный дизайн может содержать такое астрономическое число возможных вариантов, что реалистическое ограничение количества клонов в фаговой библиотеке (10¹² вариантов) будет представлять собой лишь микроскопическую долю возможного теоретического разнообразия. Из-за этой проблемы, при глубоком и обширном внесении разнообразия в библиотеку, селекция идеального сАТ варианта, предусмотренного дизайном, но практически отсутствующего в реальной библиотеке, будет недосягаема, однако, будет возможен выбор из разнообразия вторых и третьих по качеству клонов, вполне подходящих для решения поставленных задач. Библиотеки с хорошо продуманным дизайном имеют следующие предпочтительные качества: оптимальные разнообразие, размер, степень представленности клонов и плотность дисплея, высокая экспрессия, стабильность и растворимость сАТ вариантов, а также, простота дальнейшего манипулирования и оптимизации.

III. ДИСПЛЕЙ-КОНВЕЙЕР В КОССЛАБ

КОНСТРУИРОВАНИЕ сАТ БИБЛИОТЕКИ

Библиотека, использующаяся в КоссЛаб была сконструирована на основе Fab 4D5 остова, усовершенствованного для высокой стабильности и эффективности фагового дисплея. Для синтеза рандомизированных CDR была использована комбинация метода «смешанных нуклеотидов» и метода тринуклеотидных фосфорамидитов. Полученные ДНК олигонуклеотиды были клонированы в Fab остов с использованием мутагенеза по Кункелю [80]. Ограниченное аминокислотное разнообразие было внесено во все три HC CDRs (H1–H3), и только в одну L3 из трёх LC CDR: L1 и L2 были представлены единственными каноническими петлями, SVSSA и SASSLYS, соответственно. Длина L3 варьировала в пределах от четырёх до шести остатков, длина H3: 6–20 (суб-библиотека A), 7–15 (суб-библиотека B), или 6–17

остатков (суб-библиотеки С и D). Дизайн H3 для наиболее многовариантной суб-библиотеки D был основан на тринуклеотидной стратегии, кастомизированной в отношении преимущественного кодирования Туг, Ser и Gly, но также допускающей все 19 из 20 возможных аминокислот (за исключением Cys), что обеспечило высокое разнообразие H3 петель как в плане последовательностей, так и длин. Объединённая библиотека фагового дисплея содержала 10¹⁰ уникальных вариантов, что более, чем на 20 порядков меньше её теоретического разнообразия [62]. Широкомасштабное использование этой библиотеки в течение многих лет в сотнях успешных проектов привело к выработке огромного множества высокоаффинных сАТ с константами диссоциации в диапазоне 10⁻¹⁰–10⁻⁸ М против огромного разнообразия антигенов [81–100], что подтверждает принципиальную сравнимость производительности полностью синтетических библиотек антител с природной иммунной системой.

Получение белка-мишени и его иммобилизация в доступном для фагового дисплея виде, нативном и активном состоянии являются следующим критическим шагом после получения библиотеки. Первоначальный и часто используемый до сих пор метод иммобилизации антигена для биопэннинга представляет собой пассивную адсорбцию белка на активированной поверхности пластика в случайной ориентации посредством множественных неспецифических и нековалентных взаимодействий [101]. Однако, такая адсорбция обычно сопровождается некоторыми структурными изменениями в антигене, что даёт возможность выработки сАТ вариантов к адсорбированному антигену, не узнающих свободный растворённый антиген. Несмотря на это, пассивная адсорбция привлекательна своей простотой и довольно успешным, в отношении многих антигенов, применением. В настоящее время наиболее частым способом иммобилизации антигена, позволяющим избегать конформационные изменения антигена, вызванные его адсорбцией, является метод, основанный на связывании биотина и стрептавидина [102]. Эта пара широко применяется в различных исследовательских и биотехнологических исследованиях, требующих прочного и специфического межмолекулярного взаимодействия (детектирование и обогащение белков, нуклеиновых кислот и липидов, ДНК секвенирование нового поколения, протеомика, основанная на масс-спектроскопии и многое другое).

Белковый антиген может быть химически конъюгирован с биотином [103] с помощью доступных коммерческих биотинилирующих реагентов, специфичных к разнообразным функциональным группам

Е.	К.	Давыдова
----	----	----------

белка, включая первичные амины, сульфгидрилы, карбоксилы и карбониловые группы гликопротеинов [104]. Однако химическое биотинилирование может приводить ко множественным модификациям молекулы белка и маскировать природные антигенные детерминанты биотиновыми группами. Другой, наиболее щадящий белковую структуру, способ прикрепления биотина заключается в генетическом присоединении антигена к авидиновому тегу (Avi-tag), пептиду (GLNDIFEAQKIEWHE), специфически узнаваемому и эффективно биотинилируемому бактериальной биотин-лигазой BirA. Высокий уровень биотинилирования (~90%) с использованием этого фермента достигается как in vitro, после очистки антигена [105], так и in vivo, во время экспрессии антигена в клетках E. coli, несущих плазмиду, кодирующую BirA [106]. Этот уровень модификации вполне достаточен для эффективного захвата антигена стрептавидином, покрывающим лунки микропланшета или магнитные шарики, в последующем биопэннинге.

Иные аффинные теги для привязки белков к поверхности с минимальными нарушениями структуры и в единой ориентации также были использованы для иммобилизации антигенов [107], включая технологии связывания ионами металлов [108, 109], антителами [110], и белковыми лигандами [111]. В зависимости от технологии иммобилизации антигена, меняются и методы элюции фага. Наиболее распространенный элюант – кислые растворы (HCl или Gly, pH 2–3), которые разрушают как взаимодействия между антителом на поверхности фага и иммобилизованным антигеном, так и биотин-стрептавидиновый комплекс, связывающий антиген с твёрдой поверхностью. Такая элюция очень эффективна и мгновенна, однако, длительная инкубация в кислой среде может снижать инфекционность вирионов. В таком случае возможна мягкая и высокоспецифическая элюция избытком антигена, в результате которой освобождаются преимущественно фаговые частицы, специфически связанные с антигеном, и снижается количество посторонних клонов в элюате [112, 113]. Однако такой метод требует значительных дополнительных количеств высокоочищенного антигена.

Другой, наиболее прямой способ элюции связан с использованием уникального места узнавания протеазой, встроенного между антигеном и аффинным тегом, используемым для его иммобилизации [114]. Специфический протеолиз приводит к освобождению антигена со связанными антителами, существенно обогащая отбираемые фаговые частицы специфическими клонами. Связанный антиген не мешает последующей инфекции и амплификации отобранного фага.

Более того, возможно обойтись вообще без элюции, если не требуется титрование получаемого фага, при этом инфицирование бактериальных клеток проводится впрямую фагом, спонтанно диссоциирующим с поверхности магнитных шариков или в лунках микропланшетов.

Решающим преимуществом биотин-стрептавидинового взаимодействия, по сравнению со множеством других, используемых для иммобилизации макромолекул, является его высокая аффинность (фемтомолярная), поскольку диссоциация антигена, происходящая в системах с меньшей аффинностью, может приводить к необратимым потерям при многочисленных отмывках фага и существенно снижать качество отбора клонов. Кроме того, как уже отмечалось, связывание стрептавидина с биотином, как и множество других взаимодействий рецептор-лиганд, включая комплекс антитело–антиген, прерывается в низких pH, что может быть полезно при отладке и тестировании системы иммобилизации антигена.

Целый ряд химических реагентов и аффинных тегов для биотинилирования и иммобилизации антигена были опробованы и применялись в КоссЛаб в разные периоды времени и для разных антигенов (к примеру, природные белки, не несущие тегов, возможно биотинилировать лишь химическим путём), включая разработанную в КоссЛаб методику иммобилизации антигена посредством SNAP-тега, которая и будет обсуждаться в следующей главе.

АНТИГЕНЫ СО SNAP-ТЕГОМ: ИММОБИЛИЗАЦИЯ И СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ ЭЛЮЦИЯ

Несмотря на то, что связь биотина и стрептавидина не является ковалентной, она удовлетворяет всем необходимым требованиям биопэннинга, поскольку является практически недиссоциируемой (KD $\approx 10^{-15}$ M). Вместе с тем существуют производные ряда ферментов, способные к автомодификации посредством катализа ковалентного присоединения к добавленному специально сконструированному синтетическому лиганду, в том числе и присоединенному к нерастворимому матриксу. Белковые теги, созданные на основе ферментов, такие как Halo-тег (Promega) [115, 116], SNAP-тег [117–119] и CLIP-тег [119–120] (оба – New England Biolabs) применяются уже несколько лет для модификации белков *in vitro* и *in vivo* с целью их локализации и визуализации в клетках с помощью флуоресцентной, электронной и сверхразрешающей микроскопии. Halo-тег является производным бактериального фермента галоалкан дегалогеназы, ковалентно соединенным посредством реактивного хлороалкан-линкера с избранной

Е. К. Давыдова

функциональной группой. SNAP-тег и CLIP-тег являются продуктами инженерных манипуляций с ферментом ДНК-репарации человека, O(6)-алкилгуанин-ДНК-алкилтрансферазой, и катализируют присоединение алкильной группы субстрата посредством тиоэфирной связи к реактивному цистеину фермента. При этом, SNAP-тег и CLIP-тег были сконструированы для реакции с производными O(6)-бензилгуанина и O(2)-бензилцитозина, соответственно. Субстратная избирательность и большой выбор флуоресцентных субстратов с разными характеристиками, позволяют использовать эти теги для ортогонального мечения белков в живой клетке.

Такие доступные в продаже субстраты, как SNAP-биотин и SNAP-связывающие магнитные шарики, позволили нам разработать и применить несколько модификаций метода иммобилизации антигена, основанных на присоединении к антигену SNAP-тега. В дополнение к более обычной биотин-стрептавидин зависимой иммобилизации, основанной на SNAP-биотинилировании белка-мишени и магнитных шариках, покрытых стрептавидином, мы протестировали также и прямую ковалентную иммобилизацию с использованием SNAP-связывающих магнитных шариков. Ковалентная природа и исключительная избирательность связывания SNAP этими магнитными шариками позволяют проводить эффективную и специфическую иммобилизацию лишь частично-очищенного антигена или даже совсем неочищенного антигена со SNAP-тегом из лизатов продуцирующих его клеток. Такая прямая ковалентная иммобилизация может быть чрезвычайно полезна для белков, проблематичных для выделения с помощью стандартных методик. Однако, в наших руках, SNAP-связывающие шарики обладают несколько меньшей способностью к связыванию антигена со SNAP-тегом и большей неспецифической адсорбцией, по сравнению с лучшими вариантами магнитных шариков, покрытых стрептавидином (Dynabeads, Invitrogen). Вместе с тем, дальнейшее улучшение и оптимизация поверхности и плотности лиганда может устранить эти проблемы SNAP-связывающих магнитных шариков.

Биотинилирование SNAP-тега – простая бимолекулярная реакция, быстрая и необратимая, не требующая избытка SNAP-биотина и, следовательно, очистки от него перед связыванием со стрептавидиновыми магнитными шариками. Для протеолитической элюции фага, обеспечивающей скорейшее обогащение элюируемого фага антигенсвязывающими клонами, мы вставили между SNAP-тегом и антигеном в SNAP(T7-2) векторе (New England Biolabs) сайты разрезания разными протеазами для сравнения: тромбином, TEV, PreScission и

3С [121]. Для дальнейшей работы мы выбрали тромбин, поскольку он показал самую быструю скорость разрезания, измеряемую секундами, по сравнению с десятками минут, показанными другими тремя специфическими протеазами в одинаковых условиях.

Теоретически, протеолиз должен приводить к освобождению только антиген-специфических клонов, в то время, как фаговые частицы, связанные со SNAP-тегом, должны при этом оставаться на магнитных шариках, однако, спонтанная естественная диссоциация фаговых частиц может существенно загрязнять элюируемый фаг. Для того, чтобы избежать загрязнения фага SNAP-тег специфическими клонами, растворимый SNAP-тег конкурент добавляется во время пэннинга. В дополнение мы обнаружили, что, подобно многим другим улучшающим растворимость тег-белкам (например, MBP, NusA, тиоредоксин, GST, SUMO и Fh8 тег [107,122]), присоединение SNAP-тега приводит к существенному улучшению растворимости, стабильности и продукции многих трудно экспрессируемых, слабо структурированных и структурно нестабильных белков.

Разработанный в КоссЛаб пэннинг-метод, модифицированный для антигенов со SNAP-тегами (Рис. 2), был с успехом использован, как будет показано в следующе главе, для получения сАТ молекул для десятков антигенов, включая вирусные белки [89, 123], а также для взаимного усовершенствования связывающих поверхностей белка G и Fab остова.

IV. СИНТЕТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА И ЧТО В НИХ ОСОБЕННОГО

сАТ превосходят натуральные антитела во многих аспектах и возможностях. Прежде всего, отбор сАТ происходит *in vitro*, что не требует трудоёмкого и затратного жизнеобеспечения лабораторных животных, и, с другой стороны, позволяет получать высококачественные аффинные реагенты, связывающиеся с белками в нативном состоянии или с их определёнными конформациями, или с отдельными формами, имеющими пост-трансляционные модификации. Кроме того, разнообразие сАТ не ограничено такими присущими иммунной системе млекопитающих проблемами, как несовместимость, или присутствие иммунодоминантного антигена, или клоновый дрейф. К тому же, если воспроизводство натуральных моноклональных антител требует постоянного поддержания и затратного хранения гибридомных клеточных линий, то сАТ клоны могут храниться практически бесконечно в виде замороженной





Рис. 2. Циклы пэннинга библиотеки фагового дисплея.

Схематически представлены принципиальные стадии цикла, одинаковые для большинства протоколов, со специфическими деталями модификации, разработанной в КоссЛаб и основанной на использовании SNAP-тега (овал) и магнитных шариков (большой круг) для иммобилизации антигена (TARGET, малый круг), и элюции фага с помощью тромбинового протеолиза.

1. Иммобилизация антигена. Может проводиться через ковалентную связь SNAP-тега с SNAP-связывающими шариками или посредством биотинилирования SNAP-тега и связывания антигена шариками, покрытыми стрептавидином. В линкере между SNAP-тегом и антигеном показано место разрезания для тромбина (LVPRGS).

2. Связывание фага при инкубации антигена, представленного на магнитных шариках с библиотекой фагового дисплея (в первом цикле) или обогащённым и амплифицированным фагом (остальные циклы).

 Несколько последовательных отмывок (3–5) с удержанием шариков магнитом удаляют несвязанные и слабосвязанные фаговые частицы.

4. Элюция антиген-специфического фага разрезанием тромбином линкера, привязывающего антиген к иммобилизованному SNAP-тегу. Примечательно, что альтернативное использование кислоты привело бы к элюции всех связанных фаговых частиц, как специфических – к антигену, SNAP-тегу, стрептавидину, поверхности шариков, так и неспецифически-связанных.

5. Амплификация фага, обогащенного антиген специфическими клонами, размножением в *E. coli* в присутствии хелперного фага.

Новый цикл пэннинга начинается с момента добавления амплицифированного обогащенного фага из предыдущего цикла к магнитным частицам с иммобилизованным антигеном. Количество иммобилизованного антигена обычно понижают в 2–5 раз по мере прохождения циклов (в рамках 500–1 nM) для преимущественного связывания растущей доли высоко-аффинных сАТ клонов. Для определения обогащения фага антиген-специфическими клонами, проводится параллельный пэннинг того же фагового компонента с пустыми магнитными шариками и сравнительное титрование фага, полученного при элюции в двух этих случаях. Для направленного уменьшения скорости диссоциации получаемых сАТ клонов рекомендуется проведение более долгих отмывок. Пэннинг может проводиться вручную, с использованием магнитых частиц (KingFisher, Thermo Fisher Scientific) или полностью автоматически, с использованием роботизированных систем. Все три метода используются в КоссЛаб.

Е.	К.	Давыдова
----	----	----------

или лиофилизированной ДНК. Использование единого остова для клонирования всех сАТ вариантов, позволяет одновременно работать с большим числом клоном, проводя секвенирование, или реформатирование, или клонирование в вектор для экспрессии в клетках бактерий или млекопитающих. Это позволило разработать и освоить высокопропускные платформы для экспрессии сАТ белков [124].

сАТ могут конкурировать с моноклональными антителами практически во всех стандартных лабораторных методах, таких, как ELISA и похожие гомогенные и гетерогенные иммуноанализы, проточная цитометрия, иммуноокрашивание, имуннопреципитация белков и хроматина и во многих других. Однако, методы, связанные с распознаванием денатурированных белков (например, белковый иммуноблот), легко осуществимые с помощью моноклональных антител, могут быть весьма проблематичны для сАТ. В отличие от большинства натуральных антител, способных узнавать короткие антигенные пептиды (длиной 8-18 аминокислот) на поверхности иммунных клеток и, таким образом, специфичных к линейным эпитопам, сАТ подвергаются отбору на основании связывания с нативной формой белка. У белка в нативном состоянии многие линейные эпитопы оказываются недоступны, полностью или частично скрыты, в результате чего получают преимущество поверхностные трёхмерные эпитопы, являющиеся наиболее эффективными для связывания сАТ. Более того, *in vitro*, хорошо структурированные белки с небольшим количеством определённых низкоэнергетических состояний представляют собой наиболее действенные антигены в то время, как белки с подвижной, слабо выраженной и нестабильной структурой не подходят для сАТ отбора, тем не менее являясь полноценными кандидатами для продукции натуральных антител *in vivo*.

Но главное преимущество отбора *in vitro* в том, что, имея строгий контроль над составом и состоянием антигена и условиями отбора, можно производить сАТ со следующими уникальными свойствами в отношении антигена : (i) связывать определённые участки на его поверхности, (ii) узнавать его отдельные конформационные состояния, (iii) вызывать желаемые конформационные изменения, и (iv) выявлять и стабилизировать неустойчивые состояния и белковые комплексы [81]. Эти беспрецедентные возможности открывают широкие перспективы для исследования и анализа макромолекулярных структур, недоступных при использовании традиционных аффинных реагентов и технологий.

ЭПИТОП-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ САТ И ПРАКТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

Продукция КоссЛаб также подтвердила возможность применения эпитоп-специфических сАТ в практической медицине. К примеру, среди отобранных сАТ, влияющих на активность изоцитратдегидрогеназы были выявлены такие, связывание с которыми приводило к реактивации мутантной формы этого фермента, ассоциированной с опухолями мозга [90]. Такого рода «активирующие молекулы» могут оказаться важнейшим лекарством против злокачественных клеточных трансформаций, вызванных мутациями, инактивирующими белковые функции. Другой пример – изучение ряда сАТ молекул, связывающихся с разными частями гликопротеина оболочки парамиксовируса, вызывающего острое респираторное заболевание. Было показано влияние таких сАТ на процесс вирусного проникновения в клетку, что позволило изучить этап слияния вирусной мембраны с клеточной, приводящий к респираторной инфекции [125].

Среди сАТ, связывающихся с минус-концом актиновых филаментов, три продемонстрировали уникальные свойства в отношении изучения динамики актина: одно из них кэппирует минус-конец, другое – перешивает, а третье – прерывает актиновые филаменты и вызывает их разборку. Эти сАТ могут помочь в изучении деталей реорганизации актиновых филаментов в здоровых и пораженных тканях человека, во время вирусной и бактериальной инфекции и раковых метастазах, а также в клетках, ответственных за врожденный и приобретённый иммунитет организма.

Кроме того, был разработан быстрый и эффективный анализ фаговых клонов, адаптирующий фаговый дисплей для производства сАТ, нейтрализующих возбудителя сибирской язвы. В результате были получены высокоаффинные нейтрализующие сАТ, отобранные против эдематозного фактора, являющегося аденилатциклазой и главным посредником патогенеза. Эти сАТ продемонстрировали сильное ингибирование продукции сАМР в заражённых клетках человека, сопоставимое с результатами, получаемыми при использовании лучших нейтрализующих моноклональных антител. Это ещё раз продемонстрировало, что возможности фагового дисплея не уступают индустрии моноклональных антител.

Существует множество экспериментальных и практических задач, требующих сАТ разных специфичностей, направленных на независимые и непересекающиеся эпитопы белка [127], например – многочисленные варианты сэндвич-иммуноанализов. Хотя такие сАТ часто получаются спонтанно, и могут быть легко выявлены с помощью эпитоп-специфической сортировки [128], иногда на поверхности

Б. П. Диобловой

белка существует один главный эпитоп, доминирующий при отборе. В таком случае, для получения сАТ к другим, независимым эпитопам, применяется эпитоп-маскирующая техника, стимулирующая связывание сАТ со вторичными антигенными детерминантами. С этой целью во время пэннинга добавляется предварительно выделенное сАТ, связывающееся с доминирующим эпитопом и исключающее его из конкуренции за связывание с фаговыми частицами. Эта техника является обычной при получении сАТ разных специфичностей в КоссЛаб, включая случаи вирусных белков: С-концевого домена нуклеопротеина вируса Эболы (EBOV NP CT) и метилтрансферазы вируса Зика (ZIKV MT), выбранных для разработки описанного в одной из последующих глав нового безотмывочного метода иммунодетектирования антигенов [123]. Этот метод, основанный на феномене белковой комплементации и соответствующий формату экпрессанализа, остро востребован в современной практической медицине. Совсем недавно техника маскировки эпитопа была применена для получения компонентов для детектирования SARS-CoV-2. При этом было показано, что сАТ, связывающееся с доминантным эпитопом Spike белка, вызывает ингибирование проникновения вируса в клетку и может быть использовано для его нейтрализации. Создание пары сАТ, независимо-связывающихся со Spike белком, и успешное детектирование вируса в новой экспресс-системе, стали важным достижением для диагностики SARS-CoV-2 во время продолжающейся пандемии [85].

КОНФОРМАЦИОННЫЕ сАТ

Довольно часто оказывается, что белок, выбранный в качестве мишени для отбора сАТ, неоднороден и представляет собой динамическую или статическую смесь ряда низкоэнергетических состояний, иногда вызванных примесью молекул лигандов или ионов некоторых металлов. В таких условиях получение сАТ, специфических к определённым конформационным состояниям белка является случайным. С другой стороны, уже при дизайне можно нацеливаться на получение сАТ к определенным структурным состояниям белка. В качестве иллюстрации приведём получение конформационных сАТ к белку, связывающему мальтозу (MBP) [88, 93]. Добавление мальтозы или её отсутствие во время пэннинга привело к получению группы высокоаффинных и конформационно-специфичных сАТ трёх классов: эндостерических (связывающихся в кармане для мальтозы), аллостерических (напротив кармана) и перистерических (рядом с карманом). Связывание этих сАТ вызывало стабилизацию MBP в

разных конформационных состояниях, выявленных в соответствующих кристаллических структурах. Происходящие при этом модуляции связывания с мальтозой: конкурентные, аллостерические или перистерические, были использованы для количественного анализа вклада связывания лиганда в конформационные изменения белка. Дальнейшее применение подобного метода для других биологических систем может существенно продвинуть анализ их энергетических ландшафтов. В частности, это касается исключительно амбициозных проектов с регуляторными белками, контролирующими физиологические ответы на внешние изменения.

ПРИМЕНЕНИЕ САТ ДЛЯ РЕШЕНИЯ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ

Как уже упоминалось, сАТ незаменимы для решения белковых структур. Они могут применяться в качестве реперных меток для одночастичной криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) за счёт увеличения массы частицы (в формате Fab – 50 кДа) и информации о её ориентации, поскольку прикрепление сАТ к определённому эпитопу частиц даёт возможность сравнивать и нормализовать по группам сотни тысяч получаемых изображений [129]. Кроме того, представляя собой легко-кристаллизуемые белки с известной структурой остова, сАТ используются в качестве кристаллизационных шаперонов, улучшающих упаковку кристаллов и предоставляющих высококачественную фазовую информацию. В частности, они существенно облегчили решение структур РНК, РНК-белковых комплексов, белковых комплексов и белков, от природы неспособных к формированию устойчивых кристаллических решёток [83, 84, 130]. В то же время конформационно-специфические сАТ помогают кристаллизации структурно нестабильных и конформационно неустойчивых макромолекул, мультикомпонентных и мультисубъединичных белков, мембранных белков и их комплексов, фиксируя их или их подвижные части в единообразной конформации [81, 82, 98, 131].

МЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ И НАНОДИСКОВЫЙ ФАГОВЫЙ ДИСПЛЕЙ

Решение структур мембранных белков является одним из наиболее амбициозных проектов в структурной биологии. Мембранные белки трудно получить в нативной форме и их естественное окружение трудно воспроизвести в условиях кристаллизации. Кроме того, структуры этих белки подвижны и нестабильны. сАТ часто используются для улучшения конформационного единообразия в качестве шаперонов при кристаллизации мембранных белков. До последнего

Е.	К.	Давыдова
----	----	----------

времени отбор сАТ для стабилизации таких белков проводился в присутствии детергентов, которые являются лишь слабой имитацией мембраны. Для создания более близких условий для мембранных белков, в КоссЛаб был разработан новый подход, объединяющий эффективность фагового дисплея с преимуществами встраивания мембранных белков в наполненные липидами нанодиски [91, 132]. Нанодиски – это содержащие липиды, замкнутые в кольцо из каркасных белков, дискоидальные частицы с контролируемым размером (5-50 нм в диаметре) и составом, которые широко используются в функциональных и структурных исследованиях мембранных белков в качестве наиболее близкой имитации мембран [133, 134]. С целью использования нанодисков в фаговом дисплее каркасные белки в их составе подвергаются биотинилированию для дальнейшего связывания магнитными частицами, покрытыми стрептавидином. Близкое подобие естественного липидного окружения и общая конфигурация нанодисков позволяют встроенным в них в нативном состоянии мембранным белкам принимать характерные для них временные конформации, которые узнаются и фиксируется молекулами сАТ. С помощью нового подхода в КоссЛаб был наработан богатый набор сАТ [91], которые узнают определённые конформационные состояния некоторых мембранных белков и могут служить кристаллизационными шаперонами, реперными метками для крио-ЭМ, а также энергетическими пробами для их структурных состояний. Эти исследования закладывают фундамент для получения структур высокого разрешения для функционально значимых конформационных состояний мембранных белков и понимания динамики их взаимопревращений.

сАТ В КАЧЕСТВЕ РЕПЕРНЫХ МЕТОК ДЛЯ КРИО-ЭМ

Одночастичная крио-ЭМ в последние два десятилетия проявила себя как мощное подспорье в структурной биологии сложных макромолекулярных систем: этот метод не предусматривает кристаллизацию и решение проблемы фазы дифракции кристалла и требует лишь небольших количеств образца [129]. Подтверждая исключительную значимость этого метода для человечества, в 2017 году Нобелевская премия по химии была присуждена Жаку Дюбоше, Йоахиму Франку и Ричарду Хендерсону за развитие крио-ЕМ для высокого разрешения структур биомолекул [135]. Поскольку успех крио-ЭМ зависит от точности определения места нахождения и ориентации частиц, и требует их достаточной массы, сначала этим методом с грандиозным успехом были исследованы симметричные и «массивные» частицы

вирусов [136, 137]. Развитие новых технологий, способствующих усовершенствованию крио-ЭМ, привело к решению структур многих крупных белковых комплексов и олигомерных мембранных белков с практически атомным разрешением, а нижний предел массы метода снизился до 50 кДа [138, 139]. сАТ существенно улучшают разрешение белковых структур, т.к их связывание увеличивает массу исследуемой частицы и даёт реперные метки для её ориентации и сравнительного анализа [140, 141].

Применение сАТ в качестве реперных меток существенно продвинуло структурные исследования в области большого семейства мембранных белков, – рецепторов, сопряжённых с G-белком (GPCR) [142–144]. В человеческом геноме закодированы сотни различных GPCR рецепторов, относящихся к трём главным классам. Они играют центральную роль в физиологическом регулировании клеточных ответов на широкий спектр сигналов как в норме, так и при заболевании, и, таким образом, представляют собой наиболее многочисленный тип поверхностных рецепторов, подвергаемых лекарственному воздействию. Для того, что избежать необходимости выработки специфических реперов для каждого конкретного рецептора, в КоссЛаб провели отбор сАТ для двух главных субклассов G-белков, связывающихся с GPCR: тримерных Gi и Gs, а также мини-Gs. Эпитоп-специфическая сортировка сАТ выявила множественные эпитопы на каждом из тримерных G-белков, причём некоторые из этих сАТ обладали кроссреактивностью и, таким образом, представляли универсальные реперные метки для большинства GPCR. Похожим образом были получены реперные метки и для представителя другой группы сигнальных партнёров GPCR рецепторов, GR киназы 1, что продемонстрировало широкую применимость этого метода. ЭМ анализ подтвердил высокую эффективность полученных сАТ в качестве единичных и двойных реперных маркеров для ряда сигнальных комплексов GPCR рецепторов [87].

Кроме того, в КоссЛаб был разработана универсальная реперная система, состоящая из белкового тега и специфических к нему сАТ молекул, элиминирующая необходимость в индивидуальном подходе к каждому мембранному белку, или даже классу белков. С этой целью инженерный вариант апоцитохрома b562, белок BRIL массой 12 кДа, был выбран в качестве тега – на концах он содержит спиральные участки, которые могут быть жёстко присоединены к α-спиралям, обычно присутствующим в петлях [145] или на концах [146–147] мембранных белков. Несколько отобранных сАТ, полученных для BRIL и доведенных до суб-наномольной аффинности с помощью

Е. К. Давыдова

фагового дисплея, продемонстрировали беспрепятственное связывание с BRIL-тегом, генетически слитым с мембранными белками в целом ряде систем. Негативное окрашивание и крио-ЭМ структуры, полученные для несущих BRIL-тег мембранных белков, подтвердили эффективность системы BRIL-сАТ в качестве универсальной реперной метки для крио-ЭМ [86]. Таким образом наметился прогресс в сторону универсализации сАТ, способствующих кристаллографическим и крио-ЭМ исследованиям, с возможностью формирования линии готовых универсальных сАТ реагентов для этих целей.

В КоссЛаб были также усовершенствованы остовы сАТ в плане увеличения жесткости их структуры и улучшения их эффективности в качестве кристаллизационных шаперонов и реперных меток. Стратегия фагового дисплея включала тепловой стресс для отбираемых клонов, с целью получения вариантов Fab-остова с более структурно жесткими участками, связывающими константные и вариабельные домены Fab. Подвижность этих участков обычно вносит беспорядок в структуру Fab-остова. Для тестирования новых вариантов соединительных петель был выбран комплекс Fab с антигеном, ранее не поддающийся кристаллизационному анализу. Усовершенствование соединительных петель привело к значительному улучшению дифракционного разрешения кристаллов, при этом не изменяя высокую аффинность и стабильность комплекса [148]. Кроме того, была улучшена растворимость сАТ за счёт увеличения количества поверхностных остатков аспарагиновой кислоты в районе паратопа. Для этого был проведен отбор вариантов клонов из фаговых библиотек, включающих Asp в качестве элемента дизайна, негативно влияющего на связывание антигена. Отобранные высокоафинные сАТ клоны приобрели окружающее паратоп полярное кольцо, что, не затрагивая их антигенсвязывающую способность, привело к существенному увеличению специфичности и растворимости, являющимися критичными для легко-агрегирующих и низко-специфичных антител [149]. Таким образом, увеличение жёсткости остова и растворимости сАТ сделало возможным дальнейшее усовершенствование сАТ в случаях, если структурные исследования их комплексов с антигеном затруднены из-за этих характеристик.

V. ИНЖЕНЕРНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСТОВА сАТ И БЕЛКА G

ИММУНОГЛОБУЛИН-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ

К счастью природа нас одарила не только молекулой IgG как основы для сАТ, но и Ід-связывающими белками для их выделения, детекции и сборки в более сложные конструкции. Несколько видов болезнетворных бактерий экспрессируют мультивалентные Igсвязывающие белки на своей поверхности. Единичные домены из ряда почти идентичных, бактериальных белков (белок А из Staphylococcus aureus, белок G из Streptococcus sp. и белок L из Peptostreptococcus magnus), были изучены как биохимически, так и структурно. Каждый из этих белков имеет индивидуальный способ связывания с антителами, в плане узнаваемой части, типа антитела и вида организма [150]. Основное место связывания белков A и G общее, и происходит с интерфейсом СН2-СН3 в Fc-фрагменте, но в это связывание вовлекаются разные аминокислотные остатки интерфейса. Белок L связывается исключительно с VL-каппа. Белки A и G, также связываются с Fab-фрагментом: белок A связывается с VH, в то время, как белок G связывается одновременно, но очень слабо, с одним из наиболее консервативных доменов антител CH1 и с коротким участком в CL-каппа, сильно различающимся среди многих изотипов антител и видов организмов.

Белки, А, G и L интенсивно применяются в биохимии, биотехнологии и медицине, включая очистку антител, иммунопреципитацию, ELISA и вестерн блот [153]. Для расширения спектра выделяемых изотипов антител и видов организмов, был разработан «универсальный» рекомбинантный химерный белок А/G состоящий из четырёх доменов белка A и двух доменов белка G, демонстрирующий характеристики обоих белков и способный связывать антитела объединённого спектра видов и изотипов [154, 155]. Кроме того, для использования в прикладной иммунологии и биотехнологии недавно были созданы синтетические лиганды, имитирующие белки A и G (пептиды, инженерные белковые домены и искусственные молекулы). Эти молекулы вполне заменяют природные белки для очистки антител и, в то же время, лишены таких недостатков, как высокая стоимость, низкая ёмкость и ограниченное время функционирования [156].

ИНЖЕНЕРНЫЙ ВАРИАНТ GA1

Белок G используется для очистки IgG за счёт его аффинности к Fc части молекулы (Kd ~ 10 nM)), в то время как его связывание CH и CL из Fab-фрагмента весьма слабое (Kd ~3 μ M). Остов 4D5 (Fab^s), используемый в фаговой библиотеке КоссЛаб имеет единичную мутацию

Е. К. Давыдова	Е.	К.	Давыдова
----------------	----	----	----------

Е123S в CL домене, внесённую для его большей стабильности. Этот Fab был использован в качестве белка-мишени для улучшения аффинности белка G, а именно его C2 домена длиной 65 аминокислотных остатков. Дизайн библиотеки белка G включал мягкую рандомизацию двух точек контакта с остовом Fab^S: одна – остатки 15–24 в β-цепи, формирующей антипараллелную β-структуру с CH, другая – остатки 37–43, взаимодействующие с низкоконсервативным α-спиральным участком, соединяющим β-цепи в CL. Один из отобранных вариантов, GA1, показал наибольшее улучшение связывания с Fab^S (почти в 20 раз), в основном, благодаря замене аминокислотных остатков NDNG в позиции 40–43 на YVHE. Кристаллическая структура комплекса GA1 и геремежаются с боковыми группами α-спирального участка SQLKS в CL, таким образом увеличивая площадь интерфейса и улучшая его комплементарность [157].

ИНЖЕНЕРНЫЙ ВАРИАНТ ОСТОВА ГАВ^{LRT}

По сравнению с диким типом белка G инженерный вариант GA1 имеет гораздо более прочное связывание с Fab^S ($K_D \sim 50$ nM), что вполне позволяет использовать его в виде генетически соединённых цепочек GA1 для формирования мультивалентных Fab-групп [157]. Однако, это связывание всё ещё имеет очень высокую скорость диссоциации, что не позволяет его использование в неравновесных условиях.

Для дальнейшей оптимизации образования GA1–Fab комплекса, мы обратили направление отбора в фаговом дисплее: теперь Fab^s остов структурно подгонялся под GA1. Дизайн библиотеки затронул остатки 123–127 (SQLKS) в CL. Мутагенез по Кункелю, с использованием NNK/NNT рандомизации дал выход в ~1010 фаговых клонов с теоретическим разнообразием в ~ 1.7×10^7 уникальных ДНК последовательностей (Рис. 3). В результате пэннинга с GA1 целый ряд клонов приобрел существенно улучшенные характеристики связывания, в то время как один, имеющий случайную делецию двух кодонов (скорее всего, произошедшую при химическом синтезе мутагенных олигонуклеотидов) показал 500-кратное увеличение аффинности к GA1. Замена оригинальной последовательности SQLKS (Fab^S) на отобранную $\Delta\Delta$ LRT (FabLRT) привела к уменьшению K_D комплекса с GA1 до ~100 pM, скорости диссоциации до ~ 2.4×10^{-4} с⁻¹ и не влияла на уровень экспрессии или стабильность Fab фрагмента [123].

Ключевой структурной основой для наблюдаемой ультравысокой аффинности Fab^{LRT}, выявленной в кристаллической структуре GA1-Fab^{LRT} оказалась гуанидиновая группа Arg124 (заменившего Lys126 в Fab^S). Существенная реорганизация и увеличение интерфейса



Белковая инженерия: достижения фагового дисплея...



E.	К.	Давыдова
----	----	----------

комплекса, вызванные делецией двух нуклеотидов, привели к упаковке этой гуанидиновой группы напротив ароматического кольца Туг40 GA1 с образованием катион-*π* связи, а также водородной связи с карбонилом основной цепи Туг40 посредством вторичного амина в *ε*-положении [123].

VI. НОВАЯ ПЛАТФОРМА Для сменяемых гав-молекул

Ультравысокая аффинность связывания Fab^{LRT} с GA1, характеризующаяся исключительно низкой скоростью диссоциации, вдохновила нас на создание модифицируемой сАТ-системы на основе GA1 модуля со сменяемым Fab^{LRT}-компонентом, обладающей мультивалентностью и мультиспецифичностью. Несмотря на то, что связь между компонентами этой системы нековалентная, мы удостоверились в специальных экспериментах, что детектируемого обмена между связанными с GA1 Fab^{LRT} не происходит, по крайней мере, в течение времени эксперимента, что является определяющим условием в некоторых специальных задачах.

Возможность создания функционально значимых генетических гибридов с GA1 (Рис. 4A) позволяет производить хитроумные аффинные реагенты в различных форматах, легко адаптируемые для решения самых разнообразных задач. Простейшим примером такого реагента являются цепочки генетически соединённых GA1 модулей разной длины (Рис. 4Б) для связывания Fab^{LRT} одной, или разных специфичностей для усиления авидности связывания или «комбинаторной» мультиспецифичности, соответственно.

GA1 может быть получен в виде гибридной молекулы с ферментами или белковыми тегами для детекции антигенов с помощью Fab^{LRT} (Рис. 4В). К примеру, мы использовали GA1 в виде гибридной молекулы с ферментом β-лактамазой (BL), а также с меченым SNAP-тегом для флуоресцентной детекции антигенов узнаваемых разными Fab^{LRT} в таких лабораторных методах, как ELISA, проточная цитометрия, флуоресцентная микроскопия. Используя пару Fab^{LRT}, узнающих неперекрывающиеся эпитопы антигена, для связывания GA1-модулей, соединёнными с комплементационными фрагментами BL [158], мы разработали новый экспресс-тест, (описанный в деталях в следующей главе), с легко изменяемой специфичностью детекции (Рис. 4Г). Кроме того, связывание двух Fab^{LRT} с GA1-модулями, прикреплёнными к димерному Fc фрагменту, может имитировать двухвалентную молекулу IgG в Fc-опосредованных процессах (Рис. 4Д). А гибриды GA1 с трансмембранными доменами (TMD) клеточных рецепторов, произведённые в эндоплазматическом ретикулуме,



Рис. 4. Система со сменяемыми Fab^{LRT} на основе GA1-модуля.

Схематические изображения адресной доставки эффекторной части гибрида с GA1-модулем посредством узнавания поверхностного антигена-мишени молекулой Fab^{LRT} (A), мультимерные цепочки GA1 для связывания с Fab^{LRT} с целью усиления авидности связывания или получения комбинаторной специфичности (фотография геля любезно предоставлена Келли О'Леари, КоссЛаб).

Б – фермент (β-лактамаза, BL) или тег (SNAP-тег), генетически соединённые с GA1-модулем для детекции антигенов с помощью флуоресцентного продукта или само-мечения, соответственно.

В – система экпресс-анализа на основе BLF-комплементации для безотмывочной детекции антигена (Ag): GA1 модули генетически соединенные с комплементационными фраментами β-лактамазы (BLF) связываются с парой Fab^{LRT}, независимо узнающих антиген, приводя к реактивации BL.

Г – гибрид GA1 с Fc даёт имитацию молекулы IgG.

Д – GA1 гибрид с Fab^H (bi-Fab) или с scFv для имитации BiTE pearentra и некоторые возможные три-специфические комплексы на основе GA1-Fab^{LRT} взаимодействия и GA1-гибридов с биспецифичной молекулой или с отдельными HV и LV (Split-scFV)

Е-Специфичность системы может быть изменена простой заменой Fab^{LRT} компонента.

351

Ε.	К.	Давыдова
----	----	----------

могут быть использованы для заякоривания разнообразных Fab^{LRT} на поверхности эукариотических клеток при исследовании клеточных сигнальных механизмов и взаимодействий, а также для многих других приложений.

Как оказалось, приобретение высокой Fab-связывающей способности инженерным GA1 сопровождалось и другими существенными изменениями, важными для использования его в качестве сАТ-связывающей платформы. В частности сродство GA1 ко всем протестированным натуральным Fab-фрагментам, включая исходный по отношению к Fab^s фрагмент Fab^H, было практически полностью нивелировано, а к Fc фрагменту – резко уменьшилось [123]. Таким образом, GA1-Fab^{LRT} связывание оказалось нечувствительным к эндогенным IgG молекулам, присутствующим во многих биологических образцах. Исключительная избирательность взаимодействия GA1-Fab^{LRT} позволила нам присоединить вторую специфичность, Fab^н или scFV в качестве эффекторной части GA1-модуля (Рис. 4E), не опасаясь конкуренции с Fab^{LRT} за связывание с GA1. Полученные bi-Fab-комплексы структурно и функционально имитируют высокоэффективные би-специфические ВіТЕ реагенты, применяемые в иммунотерапии рака, однако имеют перед ними преимущество, состоящее в возможности легкой замены одной из специфичностей, определяемой Fab^{LRT} (будут обсуждаться ниже в отдельном разделе). GA1-модули, имеющие соединённые Fab^н и scFv, или отдельные НV и LV фрагменты в качестве эффектора, представляют собой два из множества возможных три-специфических форматов (Рис. 4Е). Необходимо отметить, что изменение длины линкера между GA1 и эффектором можно легко достичь с помощью мутагенеза в случае, если антигены, задействованные в системе, удалены или стерически малодоступны.

ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗ, ОСНОВАННЫЙ НА КОМПЛЕМЕНТАЦИИ BLF

Как было упомянуто выше, мы разработали безотмывочный метод детекции антигена, основанный на GA1-Fab^{LRT} взаимодействии с использованием эффекта комплементации фрагментов ферментов, широко применяющегося для исследования белок-белковых взаимодействий. Новый метод включает две гибридные молекулы GA1, каждая из которых содержит один из двух комплементационных фрагментов β-лактамазы (BLF) в качестве эффекторной части. Эффект комплементации BLF достигается, когда две Fab^{LRT} молекулы, каждая в комплексе с одним из двух гибридов GA1-BLF, независимо связываются с двумя эпитопами одной молекулы антигена.

Это связывание позволяет BL фрагментам реассоциировать с образованием активного фермента, легко детектируемого в присутствии флуорогенного субстрата (Рис. 4Г). Очевидно, что успех комплементации напрямую зависит от соответствия длины линкера гибридной молекулы расстоянию между двумя избранными эпитопами антигена.

Вирусные эпидемии, потрясшие мир в последние годы, мотивировали нас на использование белков вирусов Эболы и Зика (EBOV NT СТ и МТ ZIKV) в качестве антигенов для детекции при разработке этого нового метода. Вначале, с помощью метода маскирования эпитопа, описанного выше, мы получили пары высоко аффинных сАТ, специфические к двум разным эпитопам упомянутых вирусных антигенов и реформатировали их в Fab^{LRT}. Чуть позднее этот метод был апробирован для детекции вируса SARS-CoV-2, с использованием пары Fab^{LRT}, специфичных к рецептор-связывающему домену Spike белка [85]. В каждом случае независимость связывания полученных пар Fab^{LRT} с вирусными антигенами была подтверждена с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса. Линкер длиной 30 аа остатков (~100 Å в растянутом состоянии) между GA1 и BLF фрагментами оказался достаточным для комплементации BL- фрагментов и воспроизводимой количественной детекции активности BL в системах для всех трёх вирусных белков [123].

Разработанный метод по сути представляет собой модификацию сэндвич-иммуноанализа и соответствует по величине предела обнаружения антигена (~10 нМ) стандартным лабораторным методам, таким как ELISA. При этом новая система, в отличие от ELISA-анализа, не нуждается в отмывках и может быть легко переключена с одного антигена на другой простой заменой пары Fab^{LRT}. Кроме того, все белковые компоненты этой системы могут быть лиофилизированы для хранения и легко регидратированы с полной реактивацией [85]. Все эти особенности нашей системы соответствуют формату экпресс-анализа, остро востребованного в современной практической медицине в связи с возрастающей необходимостью оказания мобильной медицинской помощи в условиях пандемий, природных бедствий и в странах с ограниченными ресурсами.

Успешная разработка нового экспресс-анализа подтвердила эффективность GA1 модуля в качестве прочной нековалентной связи между BL-фрагментами и Fab^{LRT} молекулами разных специфичностей, что даёт основание для применения этой платформы со сменяемыми сAT-специфичностями для самых разнообразным целей.

Е.	К.	Давыд	ова
		P 1 · · · · · · ·	

НОВЫЙ Ві-FAB ФОРМАТ СО СМЕНЯЕМЫМИ ¢АТ-СПЕЦИФИЧНОСТЯМИ

В качестве следующего приложения высокоспецифичной и ультрааффинной GA1-Fab^{LRT} платформы мы выбрали bi-Fab формат, имитирующий структурно и функционально BiTE-молекулы и позволяющий изменять одну из специфичностей путем замены Fab^{LRT} компонента.

Классические BiTE конструкции представляют собой инженерные гибридные молекулы, состоящие из двух разных scFv специфичностей. Одна связывается с Т-лимфоцитами посредством узнавания CD3-компонента Т-клеточного рецептора (TCR), а вторая – взаимодействует со специфическим белком-маркером на поверхности раковых клеток. В результате образования такого цитолитического синапса раковая клетка погибает [26, 27].

Принцип bi-Fab дизайна заключается в использовании уже опробованной нами в экспресс-анализе нековалентной привязки Fab^{LRT} молекулы к GA1-модулю гибридной молекулы для образования бимолекулярного комплекса. Поскольку, как мы уже отмечали, GA1 не имеет аффинности к Fab^H-остову, мы генетически соединили эти две части в одну гибридную молекулу. Были протестировали все возможные ориентации и обе цепи FabH для соединения с GA1. При схожести уровней экспрессии и стабильности полученных конструкций, было выбрано соединение через гибкий линкер с С-концом тяжёлой цепи Fab^H, используемое в фаговой библиотеке КосслЛаб для соединения сAT с gp3 фага M13. Добавлении Fab^{LRT} к этой конструкции приводит к образованию прочного и стабильного bi-Fab комплекса с желаемыми специфичностями [123].

Для имитации BiTE молекулы в формате bi-Fab, мы избрали две антигенных мишени: специфичный для T-лимфоцитов ко-рецептор CD3, используемый в BiTE терапии и рецептор HER2, экспрессируемый в больших количествах на поверхности раковых клеток разного типа, включая клеточную линию рака груди SKBR3. С этой целью мы выбрали три хорошо охарактеризованных антитела: апробированные в BiTE конструкциях, гуманизированные анти-CD3 моноклональные антитела, OKT3 и UCHT1; и анти-HER2 моноклональное антитело трастузумаб, применяемое в антираковой терапии. Мы сконструировали bi-Fab комплексы в нескольких комбинациях: каждое антитело было ре-форматировано как в Fab^H-, так и в Fab^{LRT}-остов, а каждый из получившихся Fab^H-вариантов был генетически присоединен к GA1-модулю с помощью Gly-Ser линкера длиной в 13 аа остатков. CD3 и HER2 специфичности были введены в комплексы bi-Fab в виде комбинации Fab^H-GA1 гибридов с Fab^{LRT} (Puc. 5)



Рис. 5. Схематическое представление цитолитического синапса, образованного biFab комплексом между Т-лимфоцитом и раковой клеткой, несущей на поверхности HER2 рецептор.

В центре представлен biFab комплекс, образующий нековалентный мостик между двумя клетками, и содержащий три модуля: FabL^{RT,} представленный ОКТЗ или UCHP1 специфичностями, узнающими CD3 ко-рецептор TCR (Т-клеточного рецептора) на поверхности Т-лимфоцита; Fab^H со специфичностью трастузумаба, взаимодействующий с Her2 рецептором на раковой клетке; и GA1, генетически соединенный с Fab^н и нековалентно связанный с Fab^{LRT} остовом. Последующая активация цитотоксичных CD8+ Т-лимфоцитов заключается, в основном, в слиянии цитолитических гранул и освобождению их содержимого по направлению к раковой клетке, в то время как активированные CD4+ хелперные Т-лимфоциты резко увеличивают секрецию цитокинов IL2 и INFg в кровоток, усиливая секреторную и цитолитическую активности лимфоцитов и ускоряя размножение иммунных клеток периферической крови. Лизис раковой клетки вызывается встраиванием молекул перфорина в её мембрану с образованием поры, через которую в цитоплазму поступают гранзимы, вызывая запрограммированную гибель раковых клеток (апоптоз). Активация Т-лимфоцита происходит и при противоположной ориентация специфичностей biFab комплекса: Fab^H может связываться с Т-лимфоцитом, а Fab^{LRT} – с раковой клеткой. Представлена компиляция цитолитического и цитокинового эффектов активации Т-лимфоцитов.

Е.	К.	Давыдова
----	----	----------

Все полученные биспецифические комбинации продемонстрировали эффективное включение Т-лимфоцитов (из препарата мононуклеарных клеток периферической крови) в образование цитолитических синапсов при их ко-культивировании с SKBR3 раковыми клетками. Активация Т-лимфоцитов определялась тремя разными анализами: определением уровня активности цитоплазматичекого фермента лактат дегидрогеназы в культуральной жидкости при лизисе клеток, вызываемом цитотоксическими CD8+ Т-лимфоцитами, и измерением секреции активированными CD4+ хелперными Т-лимфоцитами интерлекина 2 (IL2) и интерферона γ (INFγ). Как и ожидалось, функциональная активность bi-Fab комплексов была напрямую связана с наличием ковалентной связи между GA1 и Fab^H, поскольку активация Т-лимфоцитов не детектировалась в случае, когда три модуля bi-Fab комплекса были добавлены к клеткам в виде отдельных молекул, Fab^H, Fab^{LRT} и GA1 [123].

Принимая во внимание простоту замены молекулы Fab^{LRT} в bi-Fab комплексе, мы планируем дальнейшие преобразования bi-Fab формата, имитирующего BiTE конструкции. Так, с помощью множества специфических Fab^{LRT} можно проводить тестирование большого количества разных онкоспецифических маркеров на поверхности клеток в формате высокопропускной платформы. Кроме того, возможно вовлечение в формирование синапсов нескольких типов маркеров на поверхности одной раковой клетки с помощью соответствующих специфичностей Fab^{LRT} для усиления терапевтического эффекта. Множественные GA1-модули и линкеры варьирующей длины могут быть включены в дизайн мультивалентной биспецифической платформы с целью достижения большей авидности и большего стерического соответствия клеточным поверхностям с большим количеством копий определённого онкоспецифического рецептора.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящий момент Белковая Инженерия представляет собой хорошо разработанную и зрелую область науки. С дальнейшим развитием и совершенствованием белково-инженерных методов и реагентов на основе новых технологий, описанных в данном обзоре, они могут быть включены в стандартный лабораторный процесс, наравне с клонированием, экспрессией и очисткой белков для структурных исследований.

Несмотря на то, что генетическая селекция, приводящая к улучшению свойств белков, практиковалась человечеством сотни лет, реальные попытки понимания молекулярных основ фенотипических изменений и их рационального дизайна стали возможны лишь в последние годы, с появлением массивов белковых структур и беспрецедентных компьютерных возможностей для анализа и включения этой информации в дизайн белков с улучшенными и новыми характеристиками.

Важным аспектом Белковой Инженерии является возможность применения её достижений как в фундаментальной науке, так и в прикладных исследованиях. Таким образом, работая над фундаментальными проектами ориентированными на детальное понимания молекулярных основ биологических систем, мы одновременно создаём молекулы, которые могут быть исключительно важны для медицинского применения и общества в целом.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор глубоко признательна Тони Коссякову за критическое прочтение и плодотворное обсуждение обзора, и Эрне Давыдовой за техническую помощь в подготовке текста к публикации.

Конфликт интересов. Автор заявляет, что у нее нет конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

Е. К. Давыдова

ЛИТЕРАТУРА

- Paria, D., Venugopalan, P.L. (2019) Controlling Evolution: The Nobel Prize in Chemistry 2018. *IEEE Pulse*, 10, 12–16.
- 2. Samish, I. (2017) Achievements and Challenges in Computational Protein Design. *Methods in Molecular Biology*, **1529**, 21–94.
- 3. Korendovych, I.V. (2018) Rational and Semirational Protein Design. *Methods in Molecular Biology*, **1685**, 15–23.
- 4. You, L., Arnold, F.H. (1996) Directed evolution of subtilisin E in Bacillus subtilis to enhance total activity in aqueous dimethylformamide. *Protein engineering*, **9**, 77–83.
- Shao, Z., Arnold, F.H. (1996) Engineering new functions and altering existing functions. *Current Opinion* in Structural Biology, 6, 513–518.
- Moore, J.C., Arnold, F.H. (1996) Directed evolution of a para-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents. *Nature Biotechnology*, 14, 458–467.
- 7. Zhao, H., Li, Y., Arnold, F.H. (1996) Strategy for the directed evolution of a peptide ligase. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **799**, 1–5.
- Molina-Espeja, P., Vina-Gonzalez, J., Gomez-Fernandez, B.J., Martin-Diaz, J., Garcia-Ruiz, E., Alcalde, M. (2016) Beyond the outer limits of nature by directed evolution. *Biotechnology Advances*, 34, 754–767.
- Smith, G.P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228, 1315–1317.
- Parmley, S.F., Smith, G.P. (1988) Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene.* 73, 305–318.
- 11. Doorbar, J., Winter, G. (1994) Isolation of a peptide antagonist to

the thrombin receptor using phage display. *Journal of Molecular Biology*, **244**, 361–369.

- Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E., Hoogenboom, H.R. (1994) Making antibodies by phage display technology. *Annual Review of Immunology*, **12**, 433–455.
- Clackson, T., Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Winter, G. (1991) Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature*, 352, 624–628.
- 14. Marks, J.D., Ouwehand, W.H., Bye, J.M., Finnern, R., Gorick, B.D., Voak, D., Thorpe, S.J., Hughes-Jones, N.C., Winter, G. (1993) Human antibody fragments specific for human blood group antigens from a phage display library. *Biotechnology (N Y)*, **11**, 1145–1149.
- Smith, G.P., Petrenko, V.A. (1997) Phage Display. *Chemical Reviews*, 97, 391–410.
- Newton-Northup, J.R., Dickerson, M.T., Kumar, S.R., Smith, G.P., Quinn, T.P., Deutscher, S.L. (2014) In vivo bacteriophage peptide display to tailor pharmacokinetics of biological nanoparticles. *Molecular Imaging* and Biology, 16, 854–864.
- Petrenko, V.A., Smith, G.P. (2000) Phages from landscape libraries as substitute antibodies. *Protein Engineering*, 13, 589–592.
- Liang, C. T., Roscow, O. M. A., Zhang, W. (2021) Recent developments in engineering protein-protein interactions using phage display. *Protein Engineering Design & Selection*, 34.
- Nagano, K., Tsutsumi, Y. (2021) Phage Display Technology as a Powerful Platform for Antibody Drug Discovery. *Viruses*, 13, 178.
- Reader, R. H., Workman, R. G., Maddison, B. C., Gough, K. C. (2019) Advances in the Production

and Batch Reformatting of Phage Antibody Libraries. *Molecular Biotechnology*, **61**, 801–815.

- Sokullu, E., Gauthier, M. S., Coulombe, B. (2021) Discovery of Antivirals Using Phage Display. *Viruses*, 13, 1120.
- Almagro, J.C., Pedraza-Escalona, M., Arrieta, H.I., Perez-Tapia, S.M. (2019) Phage Display Libraries for Antibody Therapeutic Discovery and Development. *Antibodies (Basel)*, 8, 44.
- Gillespie, J.W., Wei, L., Petrenko, V.A. (2016) Selection of Lung Cancer-Specific Landscape Phage for Targeted Drug Delivery. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 19, 412–422.
- 24. McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G., Chiswell, D.J. (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, **348**, 552–554.
- 25. Dean, A.Q., Luo, S., Twomey, J.D., Zhang, B. (2021) Targeting cancer with antibody-drug conjugates: Promises and challenges. *mAbs*, 13, 1951427.
- 26. Einsele, H., Borghaei, H., Orlowski, R.Z., Subklewe, M., Roboz, G.J., Zugmaier, G., Kufer, P., Iskander, K., Kantarjian, H.M. (2020) The BiTE (bispecific T-cell engager) platform: Development and future potential of a targeted immuno-oncology therapy across tumor types. *Cancer*, **126**, 3192–3201.
- Baeuerle, P.A., Reinhardt, C. (2009) Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy. *Cancer Research*, 69, 4941–4944.
- Justiz Vaillant, A.A., Nessel, T.A., Zito, P.M. (2021) Immunotherapy. in *StatPearls*, Treasure Island (FL). pp.
- 29. Derebery, M.J., Christopher, L. (2021) Allergy, Immunotherapy, Alternative Treatments for Dizziness. *Otolaryngologic Clinics of North America*, **54**, 1057–1068.

- Suryadevara, C.M., Gedeon, P.C., Sanchez-Perez, L., Verla, T., Alvarez-Breckenridge, C., Choi, B.D., Fecci, P.E., Sampson, J.H. (2015) Are BiTEs the «missing link» in cancer therapy? Oncoimmunology, 4, e1008339.
- Allen, C., Zeidan, A.M., Bewersdorf, J.P. (2021) BiTEs, DARTS, BiKEs and TriKEs-Are Antibody Based Therapies Changing the Future Treatment of AML? *Life (Basel)*, 11, 465.
- Shim, H. (2017) Antibody Phage Display. Advances in Experimental Medicine and Biology, 1053, 21–34.
- Kirley, T.L., Greis, K.D., Norman, A.B. (2016) Selective disulfide reduction for labeling and enhancement of Fab antibody fragments. *Biochemical* and *Biophysical Research Commu*nications, 480, 752–757.
- Hudson, P.J., Kortt, A.A. (1999) High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. *Journal of Immunological Methods*, 231, 177–189.
- Tiller, K.E., Tessier, P.M. (2015) Advances in Antibody Design. Annual Review of Biomedical Engineering, 17, 191–216.
- 36. Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Johnson, K.S., Chiswell, D.J., Hudson, P., Winter, G. (1991) Multisubunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Research*, **19**, 4133–4137.
- 37. Gao, C., Mao, S., Lo, C.H., Wirsching, P., Lerner, R.A., Janda, K.D. (1999) Making artificial antibodies: a format for phage display of combinatorial heterodimeric arrays. *Proceedings* of the National Academy of Sciences of the USA, **96**, 6025–6030.
- Sabir, J.S., Atef, A., El-Domyati, F.M., Edris, S., Hajrah, N., Alzohairy, A.M., Bahieldin, A. (2014) Construction of naive camelids VHH repertoire in phage display-based library. *Comptes Rendus Biologies*, 337, 244–249.

- 39. Urquhart, L. (2019) Top drugs and companies by sales in 2018. *Nature Reviews Drug Discovery*, **18**, 245–245.
- Alfaleh, M.A., Alsaab, H.O., Mahmoud, A.B., Alkayyal, A.A., Jones, M.L., Mahler, S.M., Hashem, A.M. (2020) Phage Display Derived Monoclonal Antibodies: From Bench to Bedside. *Frontiers in Immunology*, 11, 1986.
- Ho, M., Pastan, I. (2009) Mammalian cell display for antibody engineering. *Methods in Molecular Biology*, **525**, 337–352, xiv.
- Lofblom, J. (2011) Bacterial display in combinatorial protein engineering. *Biotechnology Journal*, 6, 1115–1129.
- Cherf, G.M., Cochran, J.R. (2015) Applications of Yeast Surface Display for Protein Engineering. *Methods in Molecular Biology*, 1319, 155–175.
- 44. Crawford, F., Jordan, K.R., Stadinski, B., Wang, Y., Huseby, E., Marrack, P., Slansky, J.E., Kappler, J.W. (2006) Use of baculovirus MHC/peptide display libraries to characterize T-cell receptor ligands. *Immunological Re*views, **210**, 156–170.
- 45. Walsh, C.T., Garneau-Tsodikova, S., Gatto, G.J., Jr. (2005) Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 44, 7342–7372.
- Pluckthun, A. (2012) Ribosome display: a perspective. *Methods in Molecular Biology*, 805, 3–28.
- 47. Kamalinia, G., Grindel, B.J., Takahashi, T.T., Millward, S.W., Roberts, R.W. (2021) Directing evolution of novel ligands by mRNA display. *Chemical Society Reviews*, **50**, 9055–9103.
- 48. Rakonjac, J., Russel, M., Khanum, S., Brooke, S.J., Rajic, M. (2017) Filamentous Phage: Structure and

Biology. Advances in Experimental Medicine and Biology, **1053**, 1–20.

- Gamkrelidze, M., Dabrowska, K. (2014) T4 bacteriophage as a phage display platform. *Archives of Microbiology*, **196**, 473–479.
- 50. Brogan, A.P.S., Heldman, N., Hallett, J.P., Belcher, A.M. (2019) Thermally robust solvent-free biofluids of M13 bacteriophage engineered for high compatibility with anhydrous ionic liquids. *Chemical communications* (*Cambridge*), 55, 10752–10755.
- Morag, O., Sgourakis, N.G., Baker, D., Goldbourt, A. (2015) The NMR-Rosetta capsid model of M13 bacteriophage reveals a quadrupled hydrophobic packing epitope. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **112**, 971–976.
- 52. Bass, S., Greene, R., Wells, J.A. (1990) Hormone phage: an enrichment method for variant proteins with altered binding properties. *Proteins*, 8, 309–314.
- 53. Bazan, J., Calkosinski, I., Gamian, A. (2012) Phage display – a powerful technique for immunotherapy: 1. Introduction and potential of therapeutic applications. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 8, 1817–1828.
- Chasteen, L., Ayriss, J., Pavlik, P., Bradbury, A.R. (2006) Eliminating helper phage from phage display. *Nucleic Acids Research*, 34, e145.
- Sidhu, S.S. (2001) Engineering M13 for phage display. *Biomolecular engineering*, 18, 57–63.
- Azzazy, H.M., Highsmith, W.E., Jr. (2002) Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clinical Biochemistry*, 35, 425–445.
- 57. Glanville, J., Zhai, W., Berka, J., Telman, D., Huerta, G., Mehta, G.R., Ni, I., Mei, L., Sundar, P.D., Day, G.M., Cox, D., Rajpal, A., Pons, J.

(2009) Precise determination of the diversity of a combinatorial antibody library gives insight into the human immunoglobulin repertoire. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **106**, 20216–20221.

- Briney, B., Inderbitzin, A., Joyce, C., Burton, D.R. (2019) Commonality despite exceptional diversity in the baseline human antibody repertoire. *Nature*, 566, 393–397.
- 59. Osajima, T., Hoshino, T. (2016) Roles of the respective loops at complementarity determining region on the antigen-antibody recognition. *Computational Biology and Chemistry*, 64, 368–383.
- 60. Babor, M., Kortemme, T. (2009) Multi-constraint computational design suggests that native sequences of germline antibody H3 loops are nearly optimal for conformational flexibility. *Proteins*, **75**, 846–858.
- Kuroda, D., Shirai, H., Kobori, M., Nakamura, H. (2008) Structural classification of CDR-H3 revisited: a lesson in antibody modeling. *Proteins*, 73, 608–620.
- 62. Fellouse, F.A., Esaki, K., Birtalan, S., Raptis, D., Cancasci, V.J., Koide, A., Jhurani, P., Vasser, M., Wiesmann, C., Kossiakoff, A.A., Koide, S., Sidhu, S.S. (2007) High-throughput generation of synthetic antibodies from highly functional minimalist phage-displayed libraries. *Journal of Molecular Biology*, **373**, 924–940.
- 63. Adler, A.S., Mizrahi, R.A., Spindler, M.J., Adams, M.S., Asensio, M.A., Edgar, R.C., Leong, J., Leong, R., Roalfe, L., White, R., Goldblatt, D., Johnson, D.S. (2017) Rare, highaffinity anti-pathogen antibodies from human repertoires, discovered using microfluidics and molecular genomics. *mAbs*, 9, 1282–1296.
- 64. Gerard, A., Woolfe, A., Mottet, G., Reichen, M., Castrillon, C., Men-

rath, V., Ellouze, S., Poitou, A., Doineau, R., Briseno-Roa, L., Canales-Herrerias, P., Mary, P., Rose, G., Ortega, C., Delince, M., Essono, S., Jia, B., Iannascoli, B., Richard-Le Goff, O., Kumar, R., Stewart, S.N., Pousse, Y., Shen, B., Grosselin, K., Saudemont, B., Sautel-Caille, A., Godina, A., McNamara, S., Eyer, K., Millot, G.A., Baudry, J., England, P., Nizak, C., Jensen, A., Griffiths, A.D., Bruhns, P., Brenan, C. (2020) High-throughput single-cell activitybased screening and sequencing of antibodies using droplet microfluidics. *Nature Biotechnology*, **38**, 715–721.

- 65. Chan, S.K., Rahumatullah, A., Lai, J.Y., Lim, T.S. (2017) Naive Human Antibody Libraries for Infectious Diseases. Advances in Experimental Medicine and Biology, 1053, 35–59.
- Bashir, S., Paeshuyse, J. (2020) Construction of Antibody Phage Libraries and Their Application in Veterinary Immunovirology. *Antibodies (Basel)*, 9, 21.
- Binz, H.K., Pluckthun, A. (2005) Engineered proteins as specific binding reagents. *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 459–469.
- Ahmadi, M.K.B., Mohammadi, S.A., Makvandi, M., Mamouei, M., Rahmati, M., Dehghani, H., Wood, D.W. (2021) Recent Advances in the Scaffold Engineering of Protein Binders. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 22, 878–891.
- 69. Sidhu, S.S., Fellouse, F.A. (2006) Synthetic therapeutic antibodies. *Nature Chemical Biology*, **2**, 682–688.
- Adams, J.J., Sidhu, S.S. (2014) Synthetic antibody technologies. *Current Opinion in Structural Biology*, 24, 1–9.
- Nissim, A., Hoogenboom, H.R., Tomlinson, I.M., Flynn, G., Midgley, C., Lane, D., Winter, G. (1994) Antibody fragments from a 'single pot' phage

display library as immunochemical reagents. *The EMBO Journal*, **13**, 692–698.

- 72. Yang, H.Y., Kang, K.J., Chung, J.E., Shim, H. (2009) Construction of a large synthetic human scFv library with six diversified CDRs and high functional diversity. *Molecules and Cells*, 27, 225–235.
- 73. Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellnhofer, G., Hoess, A., Wolle, J., Pluckthun, A., Virnekas, B. (2000) Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *Journal of Molecular Biology*, 296, 57–86.
- 74. Van den Brulle, J., Fischer, M., Langmann, T., Horn, G., Waldmann, T., Arnold, S., Fuhrmann, M., Schatz, O., O'Connell, T., O'Connell, D., Auckenthaler, A., Schwer, H. (2008) A novel solid phase technology for high-throughput gene synthesis. *Biotechniques*, **45**, 340–343.
- 75. Silacci, M., Brack, S., Schirru, G., Marlind, J., Ettorre, A., Merlo, A., Viti, F., Neri, D. (2005) Design, construction, characterization of a large synthetic human antibody phage display library. *Proteomics*, 5, 2340–2350.
- 76. Tiller, T., Schuster, I., Deppe, D., Siegers, K., Strohner, R., Herrmann, T., Berenguer, M., Poujol, D., Stehle, J., Stark, Y., Hessling, M., Daubert, D., Felderer, K., Kaden, S., Kolln, J., Enzelberger, M., Urlinger, S. (2013) A fully synthetic human Fab antibody library based on fixed VH/VL framework pairings with favorable biophysical properties. *mAbs*, 5, 445–470.
- 77. Rothe, C., Urlinger, S., Lohning, C., Prassler, J., Stark, Y., Jager, U., Hubner, B., Bardroff, M., Pradel, I., Boss, M., Bittlingmaier, R., Bataa, T., Frisch, C., Brocks, B., Honeg-

ger, A., Urban, M. (2008) The human combinatorial antibody library HuCAL GOLD combines diversification of all six CDRs according to the natural immune system with a novel display method for efficient selection of high-affinity antibodies. *Journal of Molecular Biology*, **376**, 1182–1200.

- Bai, X., Shim, H. (2017) Construction of a scFv Library with Synthetic, Non-combinatorial CDR Diversity. *Methods in Molecular Biology*, 1575, 15–29.
- Fellouse, F.A., Li, B., Compaan, D.M., Peden, A.A., Hymowitz, S.G., Sidhu, S.S. (2005) Molecular recognition by a binary code. *Journal of Molecular Biology*, 348, 1153–1162.
- Kunkel, T.A., Bebenek, K., McClary, J. (1991) Efficient site-directed mutagenesis using uracil-containing DNA. *Methods Enzymol* 204, 125–139.
- Paduch, M., Koide, A., Uysal, S., Rizk, S.S., Koide, S., Kossiakoff, A.A. (2013) Generating conformationspecific synthetic antibodies to trap proteins in selected functional states. *Methods*, 60, 3–14.
- Paduch, M., Kossiakoff, A.A. (2017) Generating Conformation and Complex-Specific Synthetic Antibodies. *Methods in Molecular Biology*, 1575, 93–119.
- 83. Ye, J.D., Tereshko, V., Frederiksen, J.K., Koide, A., Fellouse, F.A., Sidhu, S.S., Koide, S., Kossiakoff, A.A., Piccirilli, J.A. (2008) Synthetic antibodies for specific recognition and crystallization of structured RNA. *Proceedings of the National Academy* of Sciences of the USA, **105**, 82–87.
- 84. Shao, Y., Huang, H., Qin, D., Li, N.S., Koide, A., Staley, J.P., Koide, S., Kossiakoff, A.A., Piccirilli, J.A. (2016) Specific Recognition of a Single-Stranded RNA Sequence by a Synthetic Antibody Fragment. *Journal of Molecular Biology*, **428**, 4100–4114.

- 85. Slezak, T., Kossiakoff, A.A. (2021) Engineered Ultra-High Affinity Synthetic Antibodies for SARS-CoV-2 Neutralization and Detection. *Journal* of Molecular Biology, 433, 166956.
- 86. Mukherjee, S., Erramilli, S.K., Ammirati, M., Alvarez, F.J.D., Fennell, K.F., Purdy, M.D., Skrobek, B.M., Radziwon, K., Coukos, J., Kang, Y., Dutka, P., Gao, X., Qiu, X., Yeager, M., Eric Xu, H., Han, S., Kossiakoff, A.A. (2020) Synthetic antibodies against BRIL as universal fiducial marks for single-particle cryoEM structure determination of membrane proteins. *Nature Communications*, **11**, 1598.
- Dutka, P., Mukherjee, S., Gao, X., Kang, Y., de Waal, P.W., Wang, L., Zhuang, Y., Melcher, K., Zhang, C., Xu, H.E., Kossiakoff, A.A. (2019) Development of "Plug and Play" Fiducial Marks for Structural Studies of GPCR Signaling Complexes by Single-Particle Cryo-EM. *Structure*, 27, 1862–1874 e1867.
- 88. Mukherjee, S., Griffin, D.H., Horn, J.R., Rizk, S.S., Nocula-Lugowska, M., Malmqvist, M., Kim, S.S., Kossiakoff, A.A. (2018) Engineered synthetic antibodies as probes to quantify the energetic contributions of ligand binding to conformational changes in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, **293**, 2815–2828.
- 89. Radwanska, M.J., Jaskolowski, M., Davydova, E., Derewenda, U., Miyake, T., Engel, D.A., Kossiakoff, A.A., Derewenda, Z.S. (2018) The structure of the C-terminal domain of the nucleoprotein from the Bundibugyo strain of the Ebola virus in complex with a pan-specific synthetic Fab. Acta Crystallographica Section D-Structural Biology, 74, 681–689.
- 90. Rizk, S.S., Mukherjee, S., Koide, A., Koide, S., Kossiakoff, A.A. (2017) Targeted rescue of cancer-associated IDH1 mutant activity using an engineered synthetic antibody. *Scientific Reports*, 7, 556.

- 91. Dominik, P.K., Borowska, M.T., Dalmas, O., Kim, S.S., Perozo, E., Keenan, R.J., Kossiakoff, A.A. (2016) Conformational Chaperones for Structural Studies of Membrane Proteins Using Antibody Phage Display with Nanodiscs. *Structure*, 24, 300–309.
- 92. Rizk, S.S., Kouadio, J.L., Szymborska, A., Duguid, E.M., Mukherjee, S., Zheng, J., Clevenger, C.V., Kossiakoff, A.A. (2015) Engineering synthetic antibody binders for allosteric inhibition of prolactin receptor signaling. *Cell Communication and Signaling*, **13**, 1.
- 93. Rizk, S.S., Paduch, M., Heithaus, J.H., Duguid, E.M., Sandstrom, A., Kossiakoff, A.A. (2011) Allosteric control of ligand-binding affinity using engineered conformationspecific effector proteins. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18, 437–442.
- 94. Brawley, C.M., Uysal, S., Kossiakoff, A.A., Rock, R.S. (2010) Characterization of engineered actin binding proteins that control filament assembly and structure. *PLoS One*, 5, e13960.
- 95. Yu, Y., Zheng, Q., Erramilli, S.K., Pan, M., Park, S., Xie, Y., Li, J., Fei, J., Kossiakoff, A.A., Liu, L., Zhao, M. (2021) K29-linked ubiquitin signaling regulates proteotoxic stress response and cell cycle. *Nature Chemical Biology*, **17**, 896–905.
- Nocula-Lugowska, M., Lugowski, M., Salgia, R., Kossiakoff, A.A. (2015) Engineering Synthetic Antibody Inhibitors Specific for LD2 or LD4 Motifs of Paxillin. *Journal of Molecular Biology*, 427, 2532–2547.
- 97. Sun, J., Paduch, M., Kim, S.A., Kramer, R.M., Barrios, A.F., Lu, V., Luke, J., Usatyuk, S., Kossiakoff, A.A., Tan, S. (2018) Structural basis for activation of SAGA histone ace-tyltransferase Gcn5 by partner sub-unit Ada2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 115, 10010–10015.

- 98. Mateja, A., Paduch, M., Chang, H.Y., Szydlowska, A., Kossiakoff, A.A., Hegde, R.S., Keenan, R.J. (2015) Protein targeting. Structure of the Get3 targeting factor in complex with its membrane protein cargo. *Science*, **347**, 1152–1155.
- 99. Shukla, A.K., Manglik, A., Kruse, A.C., Xiao, K., Reis, R.I., Tseng, W.C., Staus, D.P., Hilger, D., Uysal, S., Huang, L.Y., Paduch, M., Tripathi-Shukla, P., Koide, A., Koide, S., Weis, W.I., Kossiakoff, A.A., Kobilka, B.K., Lefkowitz, R.J. (2013) Structure of active betaarrestin-1 bound to a G-proteincoupled receptor phosphopeptide. *Nature*, **497**, 137–141.
- Lokareddy, R.K., Ko, Y.H., Hong, N., Doll, S.G., Paduch, M., Niederweis, M., Kossiakoff, A.A., Cingolani, G. (2020) Recognition of an alpha-helical hairpin in P22 large terminase by a synthetic antibody fragment. Acta Crystallographica Section D-Structural Biology, 76, 876–888.
- 101. Carmen, S., Jermutus, L. (2002) Concepts in antibody phage display. *Briefings in Functional Genomics* & Proteomics, 1, 189–203.
- 102. Green, N.M. (1990) Avidin and streptavidin. *Methods in Enzymology*, **184**, 51–67.
- 103. Dundas, C.M., Demonte, D., Park, S. (2013) Streptavidin-biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**, 9343–9353.
- 104. Chattopadhaya, S., Abu Bakar, F.B., Yao, S.Q. (2009) Expanding the chemical biologist's tool kit: chemical labelling strategies and its applications. *Current Medicinal Chemistry*, **16**, 4527–4543.
- 105. Tirat, A., Freuler, F., Stettler, T., Mayr, L.M., Leder, L. (2006) Evaluation of two novel tag-based

labelling technologies for sitespecific modification of proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, **39**, 66–76.

- 106. Scholle, M.D., Collart, F.R., Kay, B.K. (2004) In vivo biotinylated proteins as targets for phage-display selection experiments. *Protein Expression and Purification*, 37, 243–252.
- 107. Young, C.L., Britton, Z.T., Robinson, A.S. (2012) Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnology Journal*, 7, 620–634.
- Dabrowska, K. (2019) Isolation of Competitive Phage Display-Modified Bacteriophage T4 with Affinity Chromatography. *Methods in Molecular Biology*, 1898, 81–87.
- Beckmann, C., Haase, B., Timmis, K.N., Tesar, M. (1998) Multifunctional g3p-peptide tag for current phage display systems. *Journal of Immunological Methods*, 212, 131–138.
- 110. Hussack, G., Baral, T.N., Baardsnes, J., van Faassen, H., Raphael, S., Henry, K.A., Zhang, J., MacKenzie, C.R. (2017) A Novel Affinity Tag, ABTAG, Its Application to the Affinity Screening of Single-Domain Antibodies Selected by Phage Display. *Frontiers in Immunology*, 8, 1406.
- 111. Mukherjee, S., Ura, M., Hoey, R.J., Kossiakoff, A.A. (2015) A New Versatile Immobilization Tag Based on the Ultra High Affinity and Reversibility of the Calmodulin-Calmodulin Binding Peptide Interaction. *Journal of Molecular Biology*, **427**, 2707–2725.
- 112. Passariello, M., Gentile, C., Ferrucci, V., Sasso, E., Vetrei, C., Fusco, G., Viscardi, M., Brandi, S., Cerino, P., Zambrano, N., Zollo, M., De Lorenzo, C. (2021) Novel human neutralizing mAbs specific

for Spike-RBD of SARS-CoV-2. *Scientific Reports*, **11**, 11046.

- 113. Krishnaswamy, S., Kabir, M. E., Miyamoto, M., Furuichi, Y., Komiyama, T. (2009) Cloning antifungal single chain fragment variable antibodies by phage display and competitive panning elution. *Analytical Biochemistry*, **395**, 16–24.
- 114. Caberoy, N.B., Zhou, Y., Jiang, X., Alvarado, G., Li, W. (2010) Efficient identification of tubbybinding proteins by an improved system of T7 phage display. *Journal of Molecular Recognition*, 23, 74–83.
- Urh, M., Rosenberg, M. (2012) HaloTag, a Platform Technology for Protein Analysis. *Current Chemical Genomics*, 6, 72–78.
- England, C.G., Luo, H., Cai, W. (2015) HaloTag technology: a versatile platform for biomedical applications. *Bioconjugate Chemistry*, 26, 975–986.
- 117. Engin, S., Fichtner, D., Wedlich, D., Fruk, L. (2013) SNAP-tag as a tool for surface immobilization. *Current Pharmaceutical Design*, 19, 5443–5448.
- 118. Hinner, M.J., Johnsson, K. (2010) How to obtain labeled proteins and what to do with them. *Current Opinion in Biotechnology*, **21**, 766–776.
- Gautier, A., Juillerat, A., Heinis, C., Correa, I.R., Jr., Kindermann, M., Beaufils, F., Johnsson, K. (2008) An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells. *Chemistry & Biology*, 15, 128–136.
- 120. Reymond, L., Lukinavicius, G., Umezawa, K., Maurel, D., Brun, M.A., Masharina, A., Bojkowska, K., Mollwitz, B., Schena, A., Griss, R., Johnsson, K. (2011) Visualizing biochemical activities in living cells through chemistry. *Chimia (Aarau)*, 65, 868–871.

- 121. Zhou, C., Yan, Y., Fang, J., Cheng, B., Fan, J. (2014) A new fusion protein platform for quantitatively measuring activity of multiple proteases. *Microbial Cell Factories*, 13, 44.
- 122. Costa, S.J., Coelho, E., Franco, L., Almeida, A., Castro, A., Domingues, L. (2013) The Fh8 tag: a fusion partner for simple and costeffective protein purification in Escherichia coli. *Protein Expression and Purification*, **92**, 163–170.
- 123. Slezak, T., Bailey, L.J., Jaskolowski, M., Nahotko, D.A., Filippova, E.V., Davydova, E.K., Kossiakoff, A.A. (2020) An engineered ultra-high affinity Fab-Protein G pair enables a modular antibody platform with multifunctional capability. *Protein Science*, **29**, 141–156.
- 124. Hornsby, M., Paduch, M., Miersch, S., Saaf, A., Matsuguchi, T., Lee, B., Wypisniak, K., Doak, A., King, D., Usatyuk, S., Perry, K., Lu, V., Thomas, W., Luke, J., Goodman, J., Hoey, R.J., Lai, D., Griffin, C., Li, Z., Vizeacoumar, F.J., Dong, D., Campbell, E., Anderson, S., Zhong, N., Graslund, S., Koide, S., Moffat, J., Sidhu, S., Kossiakoff, A., Wells, J. (2015) A High Throughput Platform for Recombinant Antibodies to Folded Proteins. *Molecular & Cellular Proteomics*, 14, 2833–2847.
- 125. Welch, B.D., Paduch, M., Leser, G.P., Bergman, Z., Kors, C.A., Paterson, R.G., Jardetzky, T.S., Kossiakoff, A.A., Lamb, R.A. (2014) Probing the functions of the paramyxovirus glycoproteins F and HN with a panel of synthetic antibodies. *Journal of Virology*, 88, 11713–11725.
- 126. Farcasanu, M., Wang, A.G., Uchanski, T., Bailey, L.J., Yue, J., Chen, Z., Wu, X., Kossiakoff, A., Tang, W.J. (2019) Rapid Discovery and Characterization of Synthetic Neutralizing Antibodies against

Anthrax Edema Toxin. Biochemistry, 58, 2996–3004.

- 127. Miller, E.A., Sung, K.J., Kongsuphol, P., Baniya, S., Aw-Yong, H.Q., Tay, V., Tan, Y., Kabir, F.M., Pang-Yeo, K., Kaspriskie, I.G., Sikes, H.D. (2020) Beyond Epitope Binning: Directed in Vitro Selection of Complementary Pairs of Binding Proteins. ACS Combinatorial Science, 22, 49–60.
- Nilvebrant, J. (2018) Kinetic Analysis and Epitope Binning Using Surface Plasmon Resonance. *Methods in Molecular Biology*, **1785**, 187–205.
- 129. Frank, J. (2002) Single-particle imaging of macromolecules by cryo-electron microscopy. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, **31**, 303–319.
- Koldobskaya, Y., Duguid, E.M., Shechner, D.M., Suslov, N.B., Ye, J., Sidhu, S.S., Bartel, D.P., Koide, S., Kossiakoff, A.A., Piccirilli, J.A. (2011) A portable RNA sequence whose recognition by a synthetic antibody facilitates structural determination. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18, 100–106.
- 131. Stuwe, T., Correia, A.R., Lin, D.H., Paduch, M., Lu, V.T., Kossiakoff, A.A., Hoelz, A. (2015) Nuclear pores. Architecture of the nuclear pore complex coat. *Science* 347, 1148–1152.
- 132. Dominik, P.K., Kossiakoff, A.A. (2015) Phage display selections for affinity reagents to membrane proteins in nanodiscs. *Methods in Enzymology*,557, 219–245.
- 133. Denisov, I.G., Sligar, S.G. (2016) Nanodiscs for structural and functional studies of membrane proteins. *Nature Structural & Molecular Biology*, 23, 481–486.
- 134. Bayburt, T.H., Sligar, S.G. (2010) Membrane protein assembly into Nanodiscs. *FEBS Letters*, **584**, 1721–1727.

- 135. Shen, P.S. (2018) The 2017 Nobel Prize in Chemistry: cryo-EM comes of age. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **410**, 2053–2057.
- Peters, R., Sikorski, R. (1999) Difference mapping cryo-EM. *Science* 283, 1133.
- Frank, J. (2001) Cryo-electron microscopy as an investigative tool: the ribosome as an example. *Bioessays*, 23, 725–732.
- 138. Cheng, Y. (2018) Single-particle cryo-EM-How did it get here and where will it go. *Science*, **361**, 876–880.
- Wu, M., Lander, G.C. (2020) How low can we go? Structure determination of small biological complexes using single-particle cryo-EM. *Current Opinion in Structural Biology*, 64, 9–16.
- 140. Uchanski, T., Masiulis, S., Fischer, B., Kalichuk, V., Lopez-Sanchez, U., Zarkadas, E., Weckener, M., Sente, A., Ward, P., Wohlkonig, A., Zogg, T., Remaut, H., Naismith, J.H., Nury, H., Vranken, W., Aricescu, A.R., Pardon, E., Steyaert, J. (2021) Megabodies expand the nanobody toolkit for protein structure determination by single-particle cryo-EM. *Nature Methods*, 18, 60–68.
- 141. Wu, X., Rapoport, T.A. (2021) Cryo-EM structure determination of small proteins by nanobodybinding scaffolds (Legobodies). Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 118.
- 142. 465 Kang, Y., Kuybeda, O., de Waal, P.W., Mukherjee, S., Van Eps, N., Dutka, P., Zhou, X. E., Bartesaghi, A., Erramilli, S., Morizumi, T., Gu, X., Yin, Y., Liu, P., Jiang, Y., Meng, X., Zhao, G., Melcher, K., Ernst, O.P., Kossiakoff, A.A., Subramaniam, S., Xu, H.E. (2018) Cryo-EM structure of human rhodopsin bound to an inhibitory G protein. *Nature*, **558**, 553–558.

- 143. Koehl, A., Hu, H., Maeda, S., Zhang, Y., Qu, Q., Paggi, J. M., Latorraca, N.R., Hilger, D., Dawson, R., Matile, H., Schertler, G. F. X., Granier, S., Weis, W. I., Dror, R. O., Manglik, A., Skiniotis, G., Kobilka, B. K. (2018) Structure of the microopioid receptor-Gi protein complex. *Nature*, **558**, 547–552.
- 144. Maeda, S., Koehl, A., Matile, H., Hu, H., Hilger, D., Schertler, G.F.X., Manglik, A., Skiniotis, G., Dawson, R.J.P., Kobilka, B.K. (2018) Development of an antibody fragment that stabilizes GPCR/Gprotein complexes. *Nature Communications*, 9, 3712.
- 145. Chun, E., Thompson, A.A., Liu, W., Roth, C.B., Griffith, M.T., Katritch, V., Kunken, J., Xu, F., Cherezov, V., Hanson, M.A., Stevens, R.C. (2012) Fusion partner toolchest for the stabilization and crystallization of G protein-coupled receptors. *Structure*, **20**, 967–976.
- 146. Vasiliauskaite-Brooks, I., Healey, R.D., Rochaix, P., Saint-Paul, J., Sounier, R., Grison, C., Waltrich-Augusto, T., Fortier, M., Hoh, F., Saied, E.M., Arenz, C., Basu, S., Leyrat, C., Granier, S. (2018) Structure of a human intramembrane ceramidase explains enzymatic dysfunction found in leukodystrophy. *Nature Communications*, 9, 5437.
- 147. Zheng, S., Sham, L.T., Rubino, F.A., Brock, K.P., Robins, W.P., Mekalanos, J.J., Marks, D.S., Bernhardt, T.G., Kruse, A.C. (2018) Structure and mutagenic analysis of the lipid II flippase MurJ from Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences* of the USA, **115**, 6709–6714.
- 148. Bailey, L.J., Sheehy, K.M., Dominik, P.K., Liang, W.G., Rui, H., Clark, M., Jaskolowski, M., Kim, Y., Deneka, D., Tang, W.J., Kossiakoff, A.A. (2018) Locking the Elbow: Improved Antibody Fab Fragments as Chaperones for Struc-

ture Determination. *Journal of Molecular Biology*, **430**, 337–347.

- Schaefer, Z.P., Bailey, L.J., Kossiakoff, A.A. (2016) A polar ring endows improved specificity to an antibody fragment. *Protein Science*, 25, 1290–1298.
- Nordenfelt, P., Bjorck, L. (2013) IgG-binding bacterial proteins and pathogenesis. *Future Microbiology*, 8, 299–301.
- 151. Bouvet, J.P. (1994) Immunoglobulin Fab fragment-binding proteins. *International Journal of Immunopharmacology*, **16**, 419–424.
- 152. Housden, N.G., Harrison, S., Roberts, S.E., Beckingham, J.A., Graille, M., Stura, E., Gore, M.G. (2003) Immunoglobulin-binding domains: Protein L from Peptostreptococcus magnus. *Biochemical Society Transactions*, **31**, 716–718.
- 153. Rigi, G., Ghaedmohammadi, S., Ahmadian, G. (2019) A comprehensive review on staphylococcal protein A (SpA): Its production and applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **66**, 454–464.
- 154. Jaturapaktrarak, C., Payattikul, P., Lohnoo, T., Kumsang, Y., Laikul, A., Pathomsakulwong, W., Yurayart, C., Tonpitak, W., Krajaejun, T. (2020) Protein A/G-based enzymelinked immunosorbent assay for detection of anti-Pythium insidiosum antibodies in human and animal subjects. *BMC Research Notes*, 13, 135.
- 155. Eliasson, M., Olsson, A., Palmcrantz, E., Wiberg, K., Inganas, M., Guss, B., Lindberg, M., Uhlen, M. (1988) Chimeric IgG-binding receptors engineered from staphylococcal protein A and streptococcal protein G. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 4323–4327.
- 156. Sheng, S., Kong, F. (2012) Separation of antigens and antibodies by immunoaffinity chromatography. *Pharmaceutical Biology*, **50**, 1038–1044.

Е. К. Давыдова

- 157. Bailey, L.J., Sheehy, K.M., Hoey, R.J., Schaefer, Z.P., Ura, M., Kossiakoff, A.A. (2014) Applications for an engineered Protein-G variant with a pH controllable affinity to antibody fragments *Journal of Immunological Methods*, **415**, 24–30.
- 158. Galarneau, A., Primeau, M., Trudeau, L.E., Michnick, S.W. (2002) Beta-lactamase protein fragment complementation assays as in vivo and in vitro sensors of protein protein interactions. *Nature Biotechnology*, **20**, 619–622.