

УДЛИНЕНИЕ ЛИНКЕРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ МЕЖДУ АНТИГЕН-УЗНАЮЩИМИ МОДУЛЯМИ ОБЕСПЕЧИВАЕТ БОЛЕЕ ЭФФЕКТИВНУЮ НАРАБОТКУ БИСПЕЦИФИЧНЫХ НАНОАНТИТЕЛ В ПЕРИПЛАЗМЕ *E. coli*

© 2024 С.В. Тиллиб^{1,2*}, О.С. Горяйнова^{1,2}

¹ Институт биологии гена РАН, 119334 Москва, Россия

² Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
119991 Москва, Россия; электронная почта: tillib@genebiology.ru

Поступила в редакцию 21.12.2023

После доработки 27.04.2024

Принята к публикации 27.04.2024

Использование технологии получения однодоменных антител (молекул NANOBODY®, также обозначаемых как наноантитела, нАТ, или молекул на основе других стабильных белковых структур) и их производных для решения актуальных задач биомедицины становится всё более популярным. Действительно, формат одного небольшого хорошо растворимого белка со стабильной структурой, полнофункционального в плане специфического узнавания, очень удобен как модуль для создания мультивалентных, би-/олигоспецифичных таргетных генно-инженерных молекул и структур. Нарботка нАТ в периплазме бактерии *E. coli* является очень удобным и достаточно универсальным способом получения аналитических количеств нАТ для первичного изучения свойств этих молекул и выбора наиболее перспективных вариантов. Сложнее пока обстоит дело с наработкой в таких же условиях би- и мультивалентных производных первично отбираемых нАТ. В данной работе разработаны и применены удлинённые линкерные последовательности (52 и 86 а.о.) между антиген-узнающими модулями в клонируемых экспрессионных конструкциях с целью повышения эффективности наработки биспецифичных наноантител (бсНТ) в периплазме бактерий *E. coli*. Три варианта модельных бсНТ, описанные в этом исследовании, были наработаны в периплазме бактерий и выделены в растворимом виде с сохранением функциональности всех белковых доменов. Если ранее наши попытки наработать в периплазме бсНТ с традиционными линкерами длиной не более 30 а.о. были безуспешными, то применённые здесь удлинённые линкеры обеспечили существенно более эффективную наработку бсНТ, сравнимую по эффективности с традиционной наработкой исходных мономерных нАТ. Использование сильно удлинённых линкеров, предположительно, может быть полезным для повышения эффективности наработки также и других бсНТ, и подобных им молекул в периплазме бактерий *E. coli*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: однодоменное антитело, наноантитело, биспецифичное антитело, много-модульное антитело.

DOI: 10.31857/S0320972524050136 EDN: YNRGGV

ВВЕДЕНИЕ

Новые лекарства и инструменты на основе моноклональных антител и их производных произвели революцию в биомедицине и иммунобиотехнологии. В последние годы, в дополнение к классическим моноклональным антителам, многими исследователями уделяется всё большее внимание инженерии рекомбинантных фрагмен-

тов антител, а также других антиген-связывающих молекул. Сегодня одной из самых перспективных технологий для создания таргетных генно-инженерных молекул, мультивалентных и би-/олигоспецифичных структур является технология получения рекомбинантных производных однодоменных антиген-связывающих фрагментов (VHH) особых антител (HCAb, Heavy-Chain only antibodies), представляющих собой гомодимер укороченной

Принятые сокращения: бсНТ – биспецифичное наноантитело; нАТ – наноантитело; ILZ – тримеризующийся домен, «изолейциновая молния»; PBS – стандартный фосфатно-солевой буферный раствор.

* Адресат для корреспонденции.

тяжёлой цепи при полном отсутствии лёгких цепей. Такие особые антитела присутствуют в норме в крови представителей семейства Camelidae и у некоторых видов хрящевых рыб в дополнение к классическим типам иммуноглобулинов [1, 2]. Верблюдовые естественным образом производят антитела, в которых модуль распознавания мишени состоит из одного вариабельного домена (VHH), рекомбинантную версию которого также обозначают как однодоменное антитело, наноантитело (нАТ) или молекула НАНОТЕЛО® (NANOBODY® и NANOBODIES® являются зарегистрированными товарными знаками «Ablynx NV», дочерней компании «Sanofi», поэтому далее в статье мы не будем использовать эти названия). Основными особенностями нАТ являются небольшие размеры (в 10 раз меньше классического антитела), высокая растворимость, стабильность (в широком диапазоне температур и pH), способность узнавать необычные, скрытые для классических антител эпитопы, возможность использования очень эффективного метода фагового дисплея для селекции оптимальных вариантов нАТ, а также простота осуществления всевозможных модификаций методами генной инженерии. нАТ могут быть соединены с Fc-доменами, другими нАТ, пептидными метками или токсинами и химически конъюгированы с лекарствами, радионуклидами, фотосенсибилизаторами и наночастицами [3–5]. Разработаны эффективные методы генно-инженерной модификации (форматирования) исходно отбираемых моновалентных нАТ с целью их адаптации для конкретного использования. Создаваемые на их основе более сложные производные молекулы, мультивалентные, биспецифичные и иные конструкции могут приобретать заметно более высокую специфичность и эффективность связывания, существенно более высокую биологическую активность. На основе форматированных нАТ могут быть разработаны новые биологические инструменты и материалы с улучшенными свойствами, например, для борьбы с вирусными или иными инфекциями [6–10]. Несмотря на уже многочисленные примеры создания и применения биспецифичных нАТ (бсНТ) [11–14], в том числе и в бактериальных системах экспрессии [15–17], в настоящее время пока не создано достаточно универсального способа их быстрого получения в растворимом и функциональном виде для предварительного тестирования и отбора наиболее перспективных вариантов. Исследователи уделяют внимание способам индукции синтеза белка, подходящим штаммам клеток, особым плазмидным векторам. В большинстве недавних работ [11, 13], в том числе рассмотренных в обзорах [15–17], бсНТ получали в клеточном лизате бактерий, однако при таких условиях бсНТ могут денатурировать и образовать

нежелательные связи с другими (загрязняющими) белками. При этом описано крайне мало подходов по получению бсНТ с достаточно хорошим выходом в условиях, приближённых к физиологическим. Одним из эффективных вариантов может быть выделение таких нАТ из периплазмы бактерий, где, в отличие от цитозоля, правильно формируются цистеиновые связи, стабилизирующие иммуноглобулиновую структуру [18].

Особое внимание при конструировании экспрессионных конструкций с двумя и более вариабельными антиген-узнающими доменами антител уделяется линкерным последовательностям (линкерам) между этими доменами. Показано, что как длина, так и состав линкеров могут влиять на эффективность наработки, стабильность и биологическую активность как генно-инженерного одноцепочечного антитела [19, 20], так и бсНТ [21]. Наиболее подробная информация о разработке линкеров между антиген-узнающими модулями при создании бсНТ приведена в обширном патенте на эту тему [22] от главного в мире разработчика технологии нАТ и биомедицинских продуктов на её основе – бельгийской компании «Ablynx NV», которая недавно стала частью глобальной фарм-компании «Sanofi». Авторы патента перечисляют с указанием ссылок большое число линкеров, которые были описаны и использовались до 2014 года включительно. В патенте длины рассматриваемых возможных линкеров варьируют от 1 до 50 аминокислотных остатков (а.о.).

Следует отметить, что наработка би- и мультивалентных производных нАТ в периплазме бактерий часто является сложной задачей. В частности, в нашей лаборатории накоплен значительный опыт по наработке в периплазме бактерий разнообразных моновалентных нАТ, однако наши первоначальные эксперименты по созданию и наработке в периплазме бактерий биспецифичных и мновалентных нАТ выявили ненадёжность (нестабильность конструкций, высокая мутабельность, очень низкая эффективность наработки и выделения растворимых нАТ) использования для этой цели наиболее популярного сегодня метода клонирования двух копий VHH, разделённых традиционной линкерной последовательностью, такой как (GGGGS)₃, или линкером длиной 28 а.о., созданным на базе шарнирного участка неканонического антитела Верблюдовых [8].

Целью данного исследования была проверка предположения о возможности повысить эффективность наработки бсНТ путём существенного удлинения линкера, создаваемого на основе комбинации более коротких линкерных последовательностей, использованных нами ранее. Основными задачами данной работы были: 1) создание новых конструкций для экспрессии бсНТ с двумя

Праймеры для ПЦР-клонирования

Название	Последовательность (5'–3')
NcoI-VNH-fd	CGAGCCGACCATGGCCCTGCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
BamHI-rev (для линкера 1)	ACCTGGATCCCTCGAGCCGCTTTCTGGTTCAGG
BamHI-rev (для линкера 2)	ACCTGGATCCCTCGAGCCGCTACGTTACCCAC
BamHI-fd	CGAGGGATCCAGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCA
Sal-rev	ATGTCCGTCGACTCTAGACCGCCACCGCGCTGCCACCT
SalI-fd	GCGGTTCGACGGCTCAGGTGCAGCTGGTGGAGT
NotI-rev	GGACTAGTGC GGCCGCTTGAGGAGACGGTGACCTGGGT
NotI-fd	GCGAGCGGCCGCTACCCGTACGAC
EcoRI-rev	GCGGAATTCTATTAGCCGGAAGCGTAGTC

При достижении культурой бактерий оптической плотности 0,6 при длине волны 600 нм добавляли 0,5 мМ раствора изопропил-бета-D-галактопиранозид (ИПТГ), температуру инкубации понижали до 28–30 °C и инкубировали клетки в течение 5 часов. Клетки осаждали центрифугированием 10 мин при 3000 g. Далее проводили процедуру осмотического шока для выделения периплазматического экстракта. Клеточный осадок суспендировали в буфере, содержащем сахарозу (50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 мМ ЭДТА, 20%-ная сахароза, 10 мМ имидазол, свежедобавленный 1 мМ PMSF), и оставляли в ледяной бане на 30 мин. Затем добавляли водный забуференный раствор (10 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 1 мМ MgCl₂), тщательно и быстро перемешивали, после чего оставляли суспензию клеток в ледяной бане ещё на 30 мин, затем клетки центрифугировали 20 мин при 16 000 g. Отбирали супернатант, содержащий периплазматический экстракт, и добавляли NaCl до конечной концентрации 0,3 М. В случае выделения периплазматического экстракта, содержащего тримеризующееся бсНТ, принципиально было использовать дополнительные модификации процедуры, включающие разрушение клеточной стенки путём добавления 5 мг/мл лизоцима в раствор, содержащий сахарозу, и добавление 20 мМ имидазола в последующий водный раствор.

Очистку целевого белка проводили с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии на Ni²⁺-NTA-агарозе, используя гель HIS-Select Nickel Affinity Gel («Sigma-Aldrich», США). Данная очистка возможна благодаря наличию на С-конце форматованного НАТ шести гистидиновых остатков (His-tag). Очистку проводили согласно протоколу производителя. Объём колонки подбирали в зависимости от объёма исходной культуры и получаемого периплазматического экстракта, в среднем колонку объёмом 0,5 мл использовали для очистки НАТ, выделяемого из 300 мл культуры. Колонку уравнивали «лизирующим» буфером (50 мМ

NaH₂PO₄, pH 8,0, 0,3 М NaCl, 10 мМ имидазол). При очистке предположительно тримеризующихся бсАТ количество имидазола в буфере увеличивали до 20 мМ. Периплазматический экстракт добавляли в колонку и проводили сорбцию белка «batch»-методом, перемешивая экстракт и агарозу на мини-ротаторе Bio RS-24 («Biosan», Латвия) в течение 30–40 мин. Затем колонку переводили в вертикальное положение, давали осесть Ni²⁺-NTA-агарозе и пропускали через неё экстракт. После этого колонку промывали в три этапа лизирующим буфером суммарным объёмом, равным 10 объёмам колонки. Элюцию белка проводили дробно, путём трёхкратного добавления одного объёма колонки элюирующего буфера (50 мМ NaH₂PO₄, pH 8,0, 0,3 М NaCl, 250 мМ имидазол). Таким образом, с одной колонки объёмом 0,5 мл получали элюат объёмом 1,5 мл.

Электрофорез белков. Качество и количество НАТ, содержащегося в полученном элюате, определяли при помощи анализа аликвот очищенных НАТ методом электрофореза в 5–19%-ном градиентном SDS-полиакриламидном геле (SDS-PAGE) в восстанавливающих условиях по Лэммли [29]. Использовали прибор MiniProtein II («Bio-Rad», США), источник питания – Эльф-4 («ДНК-Технология», Россия). В качестве восстанавливающего агента использовали ДТТ (дитиотреитол). Перед нанесением к образцам добавляли буфер (31,25 мМ Tris-HCl, pH 6,8; 12,5%-ный глицерин; 1%-ный SDS; 0,005%-ный бромфеноловый синий), пробы прогревали 10 мин при 97 °C. Электрофорез проводили в стандартном SDS-буфере (0,2 М глицин, 0,025 М Tris, 0,1%-ный SDS). Контроль разделения молекул проводили с использованием белкового маркера Precision Plus Protein Standards (161-0363, «Bio-Rad»). Примерное количество НАТ в соответствующей полосе на окрашенном геле оценивали относительно интенсивности полос маркера (так, в 5 мкл маркера интенсивность полосы 50 кДа соответствует примерно 375 нг, а полосы 20 кДа – 75 нг белка).

Иммуноферментный анализ для проверки функциональности обоих модулей НАТ в составе получаемого двухмодульного бсНТ. Использовали следующие антигены: рекомбинантный ICAM-1 человека («R&D Systems», США), рекомбинантный аллерген пыльцы берёзы Bet v 1 («Biomay AG», Австрия), рекомбинантный гемагглютинин (HA-H5) вируса гриппа H5N2 («Sino Biotechnological Inc.», Китай) и очищенный IgA человека («Имтек», Россия). Раствор антигена в концентрации 2 мкг/мл в стандартном фосфатно-солевом буферном растворе (PBS: 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 2 мМ KH₂PO₄, pH 7,4) использовали для иммобилизации антигена в течение ночи при +4 °С в лунках 96-луночного планшета с плоским дном (MaxiSorp, «Nunc», Дания). Контрольные лунки не содержали антиген, а далее обрабатывались параллельно с остальными экспериментальными лунками. Лунки промывали PBS трижды, затем блокировали в 1%-ном БСА в PBS в течение часа, снова промывали дважды PBS. Проверяемые НАТ наносили в разных концентрациях, преимущественно в диапазоне 0,4–1 мкг/мл, в 0,1%-ном БСА в 1× PBS, и инкубировали в течение 1 часа при эпизодическом перемешивании. Лунки тщательно промывали (5 раз в PBS) и добавляли вторичные мышиные анти-НА-таг-антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена («Sigma-Aldrich»), разведённые 1 : 2000 в 0,1%-ном БСА/PBS. Через 1 час лунки снова тщательно промывали и затем добавляли индикаторную смесь 1-Step Ultra TMB («Thermo Fisher Scientific», США). Для остановки реакции использовали 2 М серную кислоту. Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм на планшетном фотометре. Данные получали в трёх повторях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В нашей лаборатории уже много лет ведутся исследования, связанные с получением новых однодоменных антител (НАТ) для широкого спектра антигенов-мишеней, направленные на решение актуальных задач биомедицины. В настоящее время для ряда текущих проектов лаборатории очень актуальной задачей является создание бсНТ на базе получаемых или уже полученных ранее НАТ. Для этого предпочтительна бактериальная система экспрессии (*E. coli*), так как именно в периплазме бактерий мы рутинно нарабатываем НАТ и их производные. Ранее в нашей лаборатории уже проводили эксперименты по наработке в одной рамке считывания сразу двух НАТ, кодирующие последовательности которых разделены линкером. Однако при этом выявлялись проблемы нестабильности получаемых конструкций в бактериях (необычно высокий мутагенез выявляли

путём секвенирования и ПЦР-анализа разных получаемых клонов) и очень низкого выхода рекомбинантного белка с двумя модулями НАТ (ниже уровня фоновых бактериальных белков). Эти проблемы были как при использовании традиционного линкера (Gly₄-Ser)×3, так и линкера на основе длинного шарнирного участка особых антигенов верблюдов, состоящего из 28 аминокислотных остатков (а.о.). В данной работе был учтён прежний опыт и предпринята попытка использовать ещё более удлинённый комбинированный линкер между последовательностями, кодирующими НАТ. На рис. 1 приведена схема используемой в данной работе экспрессионной конструкции на основе плазмидного вектора pHEN6 [26] для индуцируемой экспрессии бсНТ в периплазме *E. coli*, а также представлены два варианта разработанных линкеров (мы не нашли в публикациях других авторов упоминания об использовании столь удлинённых линкеров).

Линкер 1 (длиной 52 а.о.) состоит из длинного шарнирного участка особых антител верблюда (28 а.о.), соединённого с традиционным линкером Gly₄-Ser-Gly₄-Ser-Gly₄ (как в фагмиде pIT2) с несколькими дополнительными а.о., а в линкере 2 (длиной 86 а.о.) между двумя указанными частями линкера 1 встроена дополнительная последовательность рекомбинантного домена ILZ [8]. Ранее было показано, что НАТ, к которым был добавлен ILZ-домен, действительно эффективно тримеризуются в периплазме бактерии сразу после их синтеза [8].

В данном коротком сообщении приведены примеры и первичные характеристики первых бсНТ, полученных с использованием двух указанных вариантов линкеров.

Получение и анализ бсНТ с линкером 1. В совместной работе с австрийскими партнёрами нам недавно удалось получить НАТ (aBet) к основному аллергену пыльцы берёзы (Bet v 1) [24], а также НАТ (aICAM1) к мажорному поверхностному рецепторному белку эпителия ICAM1 [23]. Одной из дальнейших целей этой работы было получение бсНТ, связывающихся с ICAM1 на поверхности клеток эпителия верхних дыхательных путей человека и способных после этого также связывать поступающий из внешней среды пыльцевой аллерген, блокируя его и тем самым препятствуя аллергической реакции. В данной работе мы получили два варианта бсНТ, содержащего оба этих НАТ, aBet-л1-aICAM1 и aICAM1-л1-aBet, но идущих в разной последовательности. Любопытно, что первый вариант бсНТ воспроизводимо (в трёх независимых повторях) заметно лучше нарабатывался параллельно в тех же условиях по сравнению со вторым вариантом (дорожки 3 и 4 соответственно на рис. 2, а). Уровень наработки для бсНТ aBet-л1-aICAM1 был вполне сравним со средним уровнем наработки

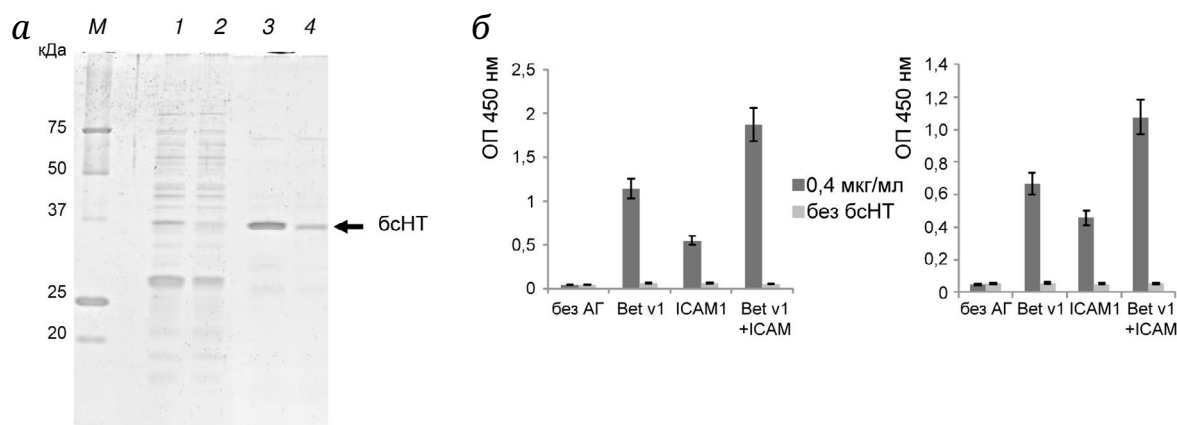


Рис. 2. SDS-PAGE и иммуноферментный анализ бсНТ аBet-l1-aICAM1 и aICAM1-l1-aBet. *а* – Электрофоретическое разделение в 5–19%-ном градиентном SDS-полиакриламидном геле белков периплазматических экстрактов (1, 2) и аффинно очищенных НАТ (3, 4). Стрелкой показано положение бсНТ. В крайней левой дорожке нанесён маркер (*М*) и указаны (в кДа) размеры маркерных полос. *б* – Иммуноанализ связывания полученных бсНТ в концентрации 0,4 мкг/мл с иммобилизованными рекомбинантными антигенами. Представлены усреднённые данные трёх измерений с указанием области разброса данных

исходных одномодульных НАТ (примерно 2 мг из 1 л культуры). Выявляемые бсНТ двигались при электрофорезе в полном соответствии с ожидаемым размером 36 кДа. В концентрации 0,4 мкг/мл оба бсНТ специфически узнавали каждый из иммобилизованных антигенов, как Bet v 1, так и ICAM1 (рис. 2, б). Таким образом, эти предварительные данные указывают на то, что в периплазме бактерии вполне возможно наработать в растворимом и активном виде заданные бсНТ. При этом порядок следования последовательностей НАТ в конструкции может иметь значение для уровня наработки.

Получение и анализ бсНТ с линкером 2. В другом нашем актуальном проекте поставлена задача разработки средства для блокировки/задержки патогенных респираторных вирусов в верхних дыхательных путях человека на основе бсНТ. Для этого мы получили и продолжаем получать как НАТ, специфически связывающие консервативные поверхностные эпитопы актуальных патогенных вирусов (в первую очередь вирусов гриппа и коронавирусов), так и НАТ к мажорным компонентам слизи или, в частности, к мажорному иммуноглобулину (IgA) слизистых тканей. Связываясь с вирусной частицей, молекулы IgA вызывают опсонизацию патогена и дают иммунной системе сигнал для его уничтожения. Ранее было показано, что для связывания и блокирования вируса предпочтительно использовать тримеризованное НАТ [8]. С целью исследования того, как влияет на наработку бсНТ добавление в состав линкера тримеризующегося домена (IL2), в данной работе был проверен второй вариант линкера (линкер 2, рис. 1). На этот раз использовались два других, полученных ранее НАТ. Одно, аНН13, связывает гемагглютинин (НА) вируса птичьего гриппа (H5N2) [8], а другое, Е7, связывает IgA человека [25]. Ожидаемый размер

мономерной версии данного бсНТ составляет примерно 39 кДа, что хорошо соответствует подвижности белка, выявляемого при электрофорезе в восстанавливающих условиях (рис. 3, а), при которых предполагаемый формирующийся тример распадается на мономеры.

В случае тримеризации размер НАТ должен увеличиться до примерно 117 кДа. В данном коротком сообщении мы пока не ставили задачу тщательно исследовать именно тримеризацию получаемого НАТ, но в качестве косвенного указания на тримеризацию нарабатываемого белка можно привести два факта. Первый: при ультрафильтрации, в процессе которой используется центрифужный концентратор с номинальным отсечением по молекулярной массе 100 кДа (Vivaspin Turbo 4, «Sartorius», Германия), данное НАТ ведёт себя как высокомолекулярный белок и практически полностью концентрируется над фильтром, тогда как другие белковые молекулы, загрязняющие исходный препарат НАТ и имеющие размер (на электрофореграмме) вплоть до 75 кДа, заметно уходят в проскок, в отличие от НАТ, движущегося при денатурирующем электрофорезе как мономерный белок размером 39 кДа. Другое указание – затруднённое выделение этого НАТ в составе периплазматического экстракта. Исходя из предположения о его трёхмерной структуре, были специально подобраны условия для более эффективного извлечения этого НАТ из периплазмы бактерий. Мы добавили процедуру разрушения клеточной стенки лизоцимом и повысили ионную силу элюирующего раствора (подробнее – в описании методов). Уровень наработки для НАТ аНА-л2-Е7 при использовании модифицированных условий выделения был также сравним со средним уровнем наработки исходных одномодульных

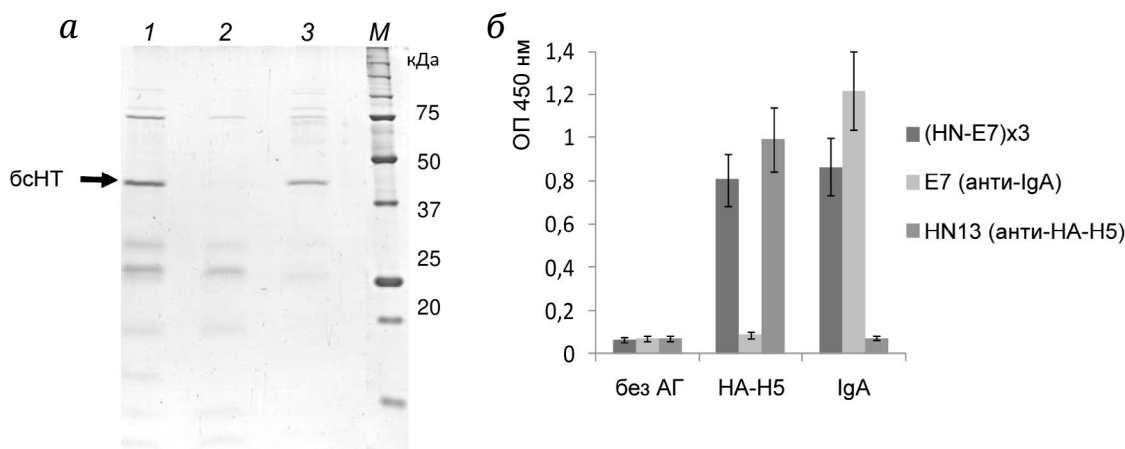


Рис. 3. SDS-PAGE и иммуноферментный анализ бсНТ аНА-л2-E7(aIgA), также обозначаемого (HN-E7)x3. *а* – Электрофоретическое разделение в 5–19%-ном градиентном SDS-полиакриламидном геле аффинно очищенного бсНТ, исходного (1), проскока на фильтре с номинальным отсечением по молекулярной массе 100 кДа (2), очищенного от мелких примесей и, предположительно, тримеризованного бсНТ (3), задержанного над фильтром с отсечением по молекулярной массе 100 кДа. Стрелкой показано положение мономерного бсНТ. В крайней правой дорожке нанесён маркер (М) и указаны (в кДа) размеры маркерных полос. *б* – Иммуноанализ связывания полученных бсНТ (HN-E7)x3, а также контрольных моновалентных НАТ (Е7 – против IgA и HN13 – против гемагглютинаина НА-Н5 вируса птичьего гриппа) в концентрации 1 мкг/мл с иммобилизованными рекомбинантными антигенами (IgA и НА-Н5). Контрольные лунки были без антигена (столбцы «без АГ»). Представлены усреднённые данные трёх измерений с указанием области разброса данных

НАТ (примерно 1 мг из 1 л культуры). Полученное НАТ обладало необходимой функциональностью и узнавало оба белка-мишени в иммуноферментном анализе (рис. 3, б). Взятые в качестве позитивных контролей мономерные НАТ, anti-IgA (Е7) [25] и НАТ против гемагглютинаина НА-Н5 вируса птичьего гриппа (HN13) [8] при связывании давали несколько более сильный сигнал. Это может отражать двукратный молярный избыток этих моноспецифических НАТ по сравнению с половинной долей Е7 и HN13 в бсНТ (при одинаковой концентрации всех трёх вариантов НАТ), а также может указывать на возможные стерические ограничения при использовании в этом анализе предположительно тримеризованного НАТ. Заметим, что для сравнения данное бсНТ также нарабатывали с линкером 1 (аНА-л1-E7), без тримеризующегося домена. Выход бсНТ был в этом случае в 2 раза выше. При использовании более коротких традиционных линкеров все три варианта описанных бсНТ вообще не удавалось наработать в детектируемых количествах.

Таким образом, мы продемонстрировали, что нарабатываемые бсНТ содержат все заданные домены в функциональном состоянии: они выделяются из периплазмы, при выделении с помощью аффинной металл-хелатной хроматографии работает His-таг, оба антиген-распознающих модуля НАТ и НА-таг функциональны в иммуноанализе. Удлиненные линкерные последовательности, по-видимому, способствуют ослаблению нежелательных взаимодействий (потенциальных рекомбинаций) между консервативными каркас-

ными GC-богатыми участками в следующих друг за другом VHH-последовательностях в случае гетерологичной бактериальной системы экспрессии, что выражается в стабильности конструкций (продуктов) и в повышении уровня наработки этих бсНТ. Мы полагаем, что в нашей работе впервые рассматриваются столь удлиненные линкеры для решения задачи повышения эффективности наработки бсНТ в периплазме. Полученные результаты определённо наполняют оптимизмом наши планы по дальнейшему использованию подобных форматов производных НАТ для самого широкого круга актуальных задач биомедицины.

Подана патентная заявка на изобретение для защиты приоритета описанных в данной статье разработок [27].

Вклад авторов. Тиллиб С.В. – концепция и руководство работой, проведение клонирования, а позже – функциональная проверка НАТ в иммуноферментном анализе; Горяйнова О.С., Тиллиб С.В. – эксперименты по наработке и выделению НАТ; Тиллиб С.В., Горяйнова О.С. – написание статьи.

Финансирование. Работа была поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (договор № 075-15-2021-1086, контракт № RF-193021X0015).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E. B., Bendahman, N., and Hamers, R. (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains, *Nature*, **363**, 446-448, <https://doi.org/10.1038/363446a0>.
2. Flajnik, M. F., and Kasahara, M. (2010) Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures, *Nat. Rev. Genet.*, **11**, 47-59, <https://doi.org/10.1038/nrg2703>.
3. Bannas, P., Hambach, J., and Koch-Nolte, F. (2017) Nanobodies and nanobody-based human heavy chain antibodies as antitumor therapeutics, *Front Immunol.*, **8**, 1603, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01603>.
4. Jovčevska, I., and Muyldermans, S. (2020) The Therapeutic Potential of Nanobodies, *BioDrugs*, **34**, 11-26, <https://doi.org/10.1007/s40259-019-00392-z>.
5. Тиллиб С. В. (2020) Перспективы использования однодоменных антител в биомедицине, *Мол. Биол.*, **54**, 362-373, <https://doi.org/10.31857/S0026898420030167>.
6. Stone, E., Hiram, T., Tanha, J., Tong-Sevinc, H., Li, S., MacKenzie, C. R., and Zhang, J. (2007) The assembly of single domain antibodies into bispecific decavalent molecules, *J. Immunol Methods*, **318**, 88-94, <https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.10.006>.
7. Hultberg, A., Temperton, N. J., Rosseels, V., Koenders, M., Gonzalez-Pajuelo, M., Schepens, B., Ibañez, L. I., Vanland-schoot, P., Schillemans, J., Saunders, M., Weiss, R. A., Saelens, X., Melero, J. A., Verrips, C. T., Van Gucht, S., and de Haard, H. J. (2011) Llama-derived single domain antibodies to build multivalent, superpotent and broadened neutralizing anti-viral molecules, *PLoS One*, **6**, e17665, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017665>.
8. Tillib, S., Ivanova, T. I., Vasilev, L. A., Rutovskaya, M. V., Saakyan, S. A., Gribova, I. Y., Tutykhina, I. L., Sedova, E. S., Lysenko, A. A., Shmarov, M. M., Logunov, D. Y., Naroditsky, B. S., and Gintsburg, A. L. (2013) Formatted single-domain antibodies can protect mice against infection with influenza virus (H5N2), *Antiviral Res.*, **97**, 245-254, <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.12.014>.
9. Huet, H. A., Gowney, J. D., Johnson, J. A., Li, J., Bilic, S., Ostrom, L., Zafari, M., Kowal, C., Yang, G., Royo, A., et al. (2014) Multivalent nanobodies targeting death receptor 5 elicit superior tumor cell killing through efficient caspase induction, *mAbs*, **6**, 1560-1570, <https://doi.org/10.4161/19420862.2014.975099>.
10. Laursen, N. S., Friesen, R. H. E., Zhu, X., Jongeneelen, M., Blokland, S., Vermond, J., van Eijgen, A., Tang, C., et al. (2018) Universal protection against influenza infection by a multidomain antibody to influenza hemagglutinin, *Science*, **362**, 598-602, <https://doi.org/10.1126/science.aag0620>.
11. Efimov, G. A., Kruglov, A. A., Khlopchatnikova, Z. V., Rozov, F. N., Mokhonov, V. V., Rose-John, S., Scheller, J., Gordon, S., Stacey, M., Drutskaya, M. S., Tillib, S. V., and Nedospasov, S. A. (2016) Cell-type-restricted anti-cytokine therapy: TNF inhibition from one pathogenic source, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 3006-3011, <https://doi.org/10.1073/pnas.1520175113>.
12. Hanke, L., Das, H., Sheward, D. J., Perez Vidakovich, L., Urgard, E., Moliner-Morro, A., Kim, C., Karl, V., Pankow, A., Smith, N. L., Porebski, B., Fernandez-Capetillo, O., et al. (2022) A bispecific monomeric nanobody induces spike trimer dimers and neutralizes SARS-CoV-2 *in vivo*, *Nat. Commun.*, **13**, 155, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27610-z>.
13. Liu, Y., Ao, K., Bao, F., Cheng, Y., Hao, Y., Zhang, H., Fu, S., Xu, J., and Wu, Q. (2022) Development of a bispecific nanobody targeting CD20 on B-cell lymphoma cells and CD3 on T cells, *Vaccines (Basel)*, **10**, 1335, <https://doi.org/10.3390/vaccines10081335>.
14. Ma, H., Zhang, X., Zeng, W., Zhou, J., Chi, X., Chen, S., Zheng, P., Wang, M., Wu, Y., Zhao, D., et al. (2022) A bispecific nanobody dimer broadly neutralizes SARS-CoV-1 & 2 variants of concern and offers substantial protection against Omicron via low-dose intranasal administration, *Cell Discov.*, **8**, 132, <https://doi.org/10.1038/s41421-022-00497-w>.
15. De Marco, A. (2015) Recombinant antibody production evolves into multiple options aimed at yielding reagents suitable for application-specific needs, *Microb. Cell Factories*, **14**, 125, <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0320-7>.
16. Sandomenico, A., Sivaccumar, J. P., and Ruvo, M. (2020) Evolution of *Escherichia coli* expression system in producing antibody recombinant fragments, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 6324, <https://doi.org/10.3390/ijms21176324>.
17. Huleani, S., Roberts, M. R., Beales, L., and Papaioannou, E. H. (2022) *Escherichia coli* as an antibody expression host for the production of diagnostic proteins: significance and expression, *Crit. Rev. Biotechnol.*, **42**, 756-753, <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1967871>.
18. Skerra, A., and Plückthun, A. (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*, *Science*, **240**, 1038-1041, <https://doi.org/10.1126/science.3285470>.
19. Le Gall, F., Reusch, U., Little, M., and Kiprianov, S. M. (2004) Effect of linker sequences between the antibody variable domains on the formation, stability and biological activity of a bispecific tandem diabody, *Protein Eng. Des. Sel.*, **17**, 357-366, <https://doi.org/10.1093/protein/gzh039>.
20. Wang, Q., Chen, Y., Park, J., Liu, X., Hu, Y., Wang, T., McFarland, K., and Betenbaugh, M. J. (2019) Design and production of bispecific antibodies, *Antibodies (Basel)*, **8**, 43, <https://doi.org/10.3390/antib8030043>.

21. Huang, C., Huang, J., Zhu, S., Tang, T., Chen, Y., and Qian, F. (2023) *Chem. Eng. Sci.*, **270**, 118521, <https://doi.org/10.1016/j.ces.2023.118521>.
22. Roobrouck, A., and Stortelers, C. (2015) Bispecific nanobodies. Applicant – ABLYNX NV (Belgium). WIPO/PCT patent publication number WO2015044386 A1. Publication date April 2, 2015.
23. Zettl, I., Ivanova, T., Zghaebi, M., Rutovskaya, M. V., Ellinger, I., Goryainova, O., Kollárová, J., Villazala-Merino, S., Lupinek, C., Weichwald, C., Drescher, A., Eckl-Dorna, J., Tillib, S. V., and Flicker, S. (2022) Generation of high affinity ICAM-1-specific nanobodies and evaluation of their suitability for allergy treatment, *Front. Immunol.*, **13**, 1022418, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1022418>.
24. Zettl, I., Ivanova, T., Strobl, M. R., Weichwald, C., Goryainova, O., Khan, E., Rutovskaya, M. V., Focke-Tejkl, M., Drescher, A., Bohle, B., Flicker, S., and Tillib, S. V. (2022) Isolation of nanobodies with potential to reduce patients' IgE binding to Bet v 1, *Allergy*, **77**, 1751-1760, <https://doi.org/10.1111/all.15191>.
25. Горяйнова О. С., Иванова Т. И., Рutowская М. В., Тиллиб С. В. (2017) Метод параллельного и последовательного генерирования однодоменных антител для протеомного анализа плазмы крови человека, *Мол. Биол.*, **51**, 985-996.
26. Conrath, K. E., Lauwereys, M., Galleni, M., Matagne, A., Frère, J. M., Kinne, J., Wyns, L., and Muyldermans, S. (2001) Beta-lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in the Camelidae, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 2807-2812, <https://doi.org/10.1128/AAC.45.10.2807-2812.2001>.
27. Тиллиб С. В., Горяйнова О. С. (2024) Биспецифичные нанотела с удлиненными линкерными последовательностями между антиген-узнающими модулями для наработки в периплазме *E. coli*. Заявка на патент РФ № 2024101830 (от 25.01.2024), ФИПС, Москва.
28. Baral, T. N., and Arbabi-Ghahroudi, M. (2012) Expression of single-domain antibodies in bacterial systems, *Methods Mol Biol.*, **911**, 257-275, https://doi.org/10.1007/978-1-61779-968-6_16.
29. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, <https://doi.org/10.1038/227680a0>.

EXTENDING LINKER SEQUENCES BETWEEN ANTIGEN-RECOGNITION MODULES PROVIDES MORE EFFECTIVE PRODUCTION OF BISPECIFIC NANOANTIBODIES IN THE PERIPLASMA OF *E. coli*

S. V. Tillib^{1,2*} and O. S. Goryainova^{1,2}

¹ *Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia*

² *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia; e-mail: tillib@genebiology.ru*

The use of technology for the production of single-domain antibodies (NANOBODY® molecules, also referred to as nanoantibodies, nAb, or molecules based on other stable protein structures) and their derivatives to solve current problems in biomedicine is becoming increasingly popular. Indeed, the format of one small, highly soluble protein with a stable structure, fully functional in terms of specific recognition, is very convenient as a module for creating multivalent, bi-/oligo-specific genetically engineered targeting molecules and structures. The production of nAb in the periplasm of the *E. coli* bacterium is a very convenient and fairly universal way to obtain analytical quantities of nAb for the initial study of the properties of these molecules and the selection of the most promising nAb options. The situation is more complicated with the production of bi- and multivalent derivatives of initially selected nAbs under the same conditions. In this work, extended linker sequences (52 and 86 aa) between antigen-recognition modules in cloned expression constructs were developed and applied in order to increase the efficiency of production of bispecific nanoantibodies (bsNB) in the periplasm of *E. coli* bacteria. Three variants of model bsNBs described in this study were produced in the periplasm of bacteria and isolated in soluble form with preservation of the functionality of all protein domains. If earlier our attempts to produce bsNB in the periplasm with traditional linkers no longer than 30 aa were unsuccessful, the extended linkers used here provided a significantly more efficient production of bsNB, comparable in efficiency to the traditional production of the original monomeric nAbs. The use of highly elongated linkers can presumably be useful for increasing the efficiency of production of other bsNBs and similar molecules in the periplasm of *E. coli* bacteria.

Keywords: single domain antibody, nanoantibody, bispecific antibody, multimodule antibody