

## ОДЕРЖАННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБІНАНТНИХ ОДНОЛАНЦЮГОВИХ ВАРІАБЕЛЬНИХ ФРАГМЕНТІВ АНТИТІЛ (scFv) ПРОТИ ГЕПАРИНЗВ'ЯЗУВАЛЬНОГО EGF-ПОДІБНОГО ФАКТОРА РОСТУ ЛЮДИНИ

О. С. Олійник  
А. А. Кабернюк  
Д. В. Колибо  
С. В. Комісаренко

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

*E-mail: lenaoliinyk@mail.ru*

Отримано 01.10.2012

Гепаринзв'язувальний EGF-подібний фактор росту — HB-EGF, що належить до EGF-родини ростових факторів, відіграє важливу роль у багатьох фізіологічних і патологічних процесах. Антитіла є важливим інструментом для дослідження функцій HB-EGF за нормальних та патологічних умов. Метою цієї роботи було виділити й вивчити деякі властивості рекомбінантних одноланцюгових варіабельних фрагментів антитіл (scFv-антитіл), специфічних до HB-EGF. Для цього сконструювали фагову імунну бібліотеку scFv-антитіл миші, імунізованої рекомбінантним розчинним HB-EGF людини. Після скринінгу бібліотеки проти HB-EGF було виділено 2 групи клонів антитіл, що характеризувалися різними наборами рестриктних фрагментів. По одному клону з кожної групи (scFv 5A та 7E) було охарактеризовано. Показано, що scFv із цих клонів здатні зв'язуватися як з людським, так і з мишачим HB-EGF. Обидва клони розпізнавали цільовий антиген у вестерн-блоті, але лише за нередукуючих умов. Методом конфокальної мікроскопії також продемонстровано специфічне зв'язування scFv 5A та 7E з клітинами лінії Vero, які характеризуються високим рівнем HB-EGF на поверхні клітини.

Таким чином, одержано scFv-антитіла проти розчинного HB-EGF, які придатні для різних видів імунохімічного аналізу, зокрема для застосування в сорбційному імуноензимному аналізі, імуноблотингу та імуноцитохімії. Імовірно, такі scFv-антитіла можуть бути використані в дослідженнях HB-EGF, а також для розроблення нових діагностичних і терапевтичних засобів.

**Ключові слова:** гепаринзв'язувальний EGF-подібний фактор росту, scFv-антитіла, фаговий дисплей.

Гепаринзв'язувальний EGF-подібний фактор росту — HB-EGF (акронім від англ. heparin-binding epidermal growth factor, like growth factor) належить до EGF-родини і є лігандом рецепторів епідермального фактора росту 1 (EGFR/ErbB1/HER1) та 4 (ErbB4/HER4) [1, 2]. HB-EGF синтезується як трансмембранний протеїн (так званий proHB-EGF) [1] і в цій формі є юстакринним регулятором. Під дією металопротеїназ вивільняється його розчинна форма — sHB-EGF, яка має активність паракринного фактора [3]. Зв'язування sHB-EGF із ErbB1 спричинює фосфорилування рецептора, що призводить до підсилення клітинної проліферації та міграції. Натомість зв'язування

sHB-EGF із ErbB4 стимулює хемотаксис, але не проліферацію клітин [4, 5]. HB-EGF відіграє важливу роль у низці фізіологічних та патологічних процесів. Так, він бере участь у загоєнні ран [6, 7], формуванні пам'яті та пластичності нервових синапсів [8], утворенні серцевих клапанів і нормальному функціонуванні серця [9], процесі імплантації бластоцисти [10]. Разом з тим HB-EGF часто відіграє провідну роль у набутті клітинами злоякісного фенотипу, зокрема здатності до онкогенності, інвазивності, метастазування та стійкості до хіміотерапії [11]. Показано його роль у прогресуванні раку легень [12], метастазуванні за раку простати [13], проліферації клітин раку шийки матки [14].

Підвищені рівні експресії HB-EGF також показано для клітин раку яєчників, шлунку і молочних залоз, клітин меланоми та гліобластоми [15].

Вищезазначене стимулює активні дослідження властивостей та функцій HB-EGF, і незамінним інструментом для таких досліджень є високоспецифічні антитіла. Попри це, є лише кілька робіт, присвячених отриманню моноклональних антитіл до HB-EGF [16–18]. Існують також комерційні моноклональні антитіла до HB-EGF [19].

Метою цієї роботи було одержання рекомбінантних одноланцюгових варіабельних фрагментів антитіл (scFv — single-chain variable fragments) до розчинної форми HB-EGF людини — sHB-EGF. За своєю природою scFv-антитіла, як і гібридомні, є моноклональними, однак мають низку переваг: моновалентність, мала молекулярна маса (близько 30 кДа), відсутність константних доменів, які зв'язуються з Fc-рецепторами лейкоцитів. За допомогою стандартних генно-інженерних підходів scFv можна об'єднати з флуоресцентними протеїнами, токсинами чи іншими функціональними молекулами. Тому формат scFv-антитіл істотно розширює можливості для дослідження функцій HB-EGF на різноманітних моделях та для розроблення новітніх терапевтичних препаратів.

### Матеріали і методи

*Імунізація піддослідних мишей.* У роботі використовували мишей лінії BALB/c (самки віком близько 4 міс.). Мишей-донорів селезінок імунізували рекомбінантним аналогом розчинної форми людського HB-EGF — sHB-EGF, отриманого як описано раніше [20]. Антиген вводили інтраперитонеально по 50 мкг на одну тварину. Першу імунізацію проводили у повному, дві наступні — в неповному ад'юванті Фрейнда (Sigma, США); проміжок між кожною імунізацією становив два тижні. Рівень специфічних антитіл у сироватках імунізованих мишей визначали методом імуноензимного аналізу.

*Імуноензимний аналіз.* Усі розчини послідовно інкубували в лунках планшета 60 хв за 37 °С. Антиген наносили в концентрації 10 мкг/мл у забуференому фізіологічному розчині — ЗФР (0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,144% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,024% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) в об'ємі 100 мкл на лунку та інкубували 60 хв за 37 °С або протягом ночі за 4 °С. Потім лунки тричі промивали ЗФР і вноси-

ли по 150 мкл 1%-го розчину знежиреного молока в ЗФР. Після інкубації знову відмивали та вносили сироватку миші або scFv-антитіла у відповідному розведенні в буфері ТФБ (ЗФР з додаванням 0,04% твіну-20). Потім лунки промивали і вносили в розведенні 1:5 000 у буфері ТФБ антитіла проти мишачих імуноглобулінів, кон'югованих з пероксидазою хрому; у випадку scFv-антитіл цьому етапу передувала інкубація 60 хв за 37 °С з моноклональними антитілами проти E-tag (Amersham, США). Для проявлення використовували розчин, що містив 5 мг ортофенілендіаміну (Sigma, США), 12,5 мл 0,2 М Na-цитратного буферу (pH 5,0) та 5 мкл пероксиду водню. Через 20 хв реакцію зупиняли, додаючи по 50 мкл на лунку 2 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Результати аналізу оцінювали за довжини хвилі 490 нм.

*Отримання імуноної фагової бібліотеки.* Бібліотеку рекомбінантних антитіл миші отримували як описано раніше [21]. Загалом, із тканини селезінки імунізованої миші за допомогою TRI Reagent (Sigma, США) виділяли загальну РНК, яку використовували як матрицю під час синтезу кДНК. Послідовності, що кодують варіабельні домени легкого та важкого імуноглобулінових ланцюгів (VH та VL), ампліфікували за допомогою набору специфічних праймерів, для дизайну яких консультувались роботою Okamoto та ін. [22]. Для ампліфікації використовували високоточну полімеразу AccuTaq LA DNA Polymerase (Sigma, США). Об'єднання нуклеотидних послідовностей VH та VL проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) за добутованими послідовностями, що перекриваються (SOE-ПЛР). Одержані ДНК-послідовності scFv вбудовували у фагмідний вектор pCANTAB-5E за сайтами для ендонуклеаз рестрикції *Sfi*I та *Not*I. Отриманою лігазною сумішшю трансформували компетентні клітини *Escherichia coli* штаму XL1-blue методом електропорації.

*Виділення фагових частинок.* Клітини, трансформовані фагмідами з послідовністю scFv, заражували фагом-хелпером M13K07 та інкубували упродовж ночі. Фагові частинки осаджували преципітацією з розчином PEG/NaCl (20% PEG-6000, 2,5 М NaCl) як описано раніше [20].

*Селекція бібліотеки проти цільового антигену.* Під час проведення селекції в лунці планшета іммобілізували цільовий антиген (10 мкг/мл у ЗФР, по 100 мкл на лунку), інкубували протягом ночі за 4 °С. Після відмивання в лунки вносили по 150 мкл 1%-го

розчину знежиреного молока в ЗФР та інкубували 60 хв за 37 °С.

Паралельно відповідну кількість фагових частинок інкубували за тих самих умов у 150 мкл ТФБ, що містив блокувальний агент.

Після відмивання в лунки вносили розчин фагових частинок та інкубували 120 хв за 37 °С. Рідину видаляли, а лунки багаторазово промивали дистильованою водою, потім ТФБ, що містив 1%-не знежирене молоко, і знову дистильованою водою. Далі в лунки додавали по 100 мкл гліцин-НСІ-буферу (рН 2,2) і 10 хв інкубували. Елюйовані в такий спосіб фаги переносили у мікропробірки й нейтралізували рН, додаючи рівний об'єм трис-гліцинового буферу (рН 8,0), і вносили у 20 мл культури клітин штаму XL 1-blue, нарощених до щільності, що відповідає  $A_{600} = 0,5$ . Клітини інкубували 90 хв за 37 °С за повільного перемішування, після чого аліквоти по 10 мкл, 100 мкл та 1 мл висівали на чашки Петрі з твердим живильним середовищем 2YT, що містило 100 мкг/мл ампіциліну. У залишок культури додавали ампіцилін до концентрації 100 мкг/мл та інкубували протягом ночі. Колонії, що виростили на чашках із твердим живильним середовищем упродовж ночі, підраховували й визначали загальний вихід клонів. За потреби з отриманих клітин виділяли фагові частинки для нового раунду селекції.

Було застосовано дві схеми селекції. Спершу провели селекцію в один, два чи три раунди за таких умов: як блокувальний агент під час інкубації фагів використовували 1%-не знежирене молоко, брали  $10^8$  фагових частинок. У другому варіанті виконали три раунди селекції, беручи під час кожного раунду по  $10^{14}$  фагових частинок. Фаги блокували з додаванням 1%-го знежиреного молока та 1%-го сироваткового альбуміну бика. Перед інкубацією із цільовим антигеном розчин фагових частинок виснажували, інкубуючи 60 хв у лунці з іммобілізованим контрольним антигеном — рекомбінантною субодиницею А дифтерійного токсину.

**Фільтр-аналіз (Lift Assay) колоній.** Для попереднього відбору позитивних клонів колонії пересівали на чашки Петрі з твердим живильним середовищем 2YT, що містило 2% глюкози та ампіцилін до кінцевої концентрації 100 мкг/мл. Робили відбитки колоній на нітроцелюлозну мембрану, яку попередньо інкубували в 5%-му розчині знежиреного молока в ЗФР 60 хв за 37 °С. Паралельно на такий самий за розміром мем-

брані іммобілізували НВ-EGF (інкубація протягом ночі в 10 мл розчину в ЗФР, з концентрацією антигену 10 мкг/мл, та ще 60 хв у 5%-му розчині знежиреного молока). Нітроцелюлозну мембрану з іммобілізованим НВ-EGF переносили на чашки з твердим живильним середовищем 2YT, що містило 100 мкг/мл ампіциліну й 1 мМ IPTG — індуктор експресії цільового протеїну, поверх цієї мембрани накладали мембрану з відбитками колоній (колоніями вгору) та інкубували упродовж ночі за 30 °С. Після цього мембрану з іммобілізованим НВ-EGF промивали й переносили на 30 хв у 5%-й розчин знежиреного молока в ЗФР. Потім мембрану 60 хв послідовно інкубували з антитілами проти E-tag та кон'югованими з пероксидазою хрому антитілами проти імуноглобулінів миші, промивали й переносили в 0,06% розчин діамінобензидину в ЗФР, що містив 0,03% пероксиду водню, для виявлення відбитків.

**Константу афінності scFv-антитіл** визначали згідно з [23].

**Імуноблотинг.** Після проведення електрофорезу протеїни переносили на нітроцелюлозну мембрану шляхом електроперенесення за сили струму 38 мА 75 хв. Далі нітроцелюлозну мембрану на 60 хв за 37 °С вміщували у блокувальний розчин (5%-не знежирене молоко в ЗФР). Після блокування мембрану переносили у розчин scFv у буфері ТФБ (1:1) та інкубували 60 хв за 37 °С, промивали і вміщували в розчин антитіл проти маркерної послідовності, зливої з scFv (E-tag), у буфері ТФБ. Через 60 хв інкубації за 37 °С мембрану промивали і переносили в розчин антитіл проти мишачих імуноглобулінів, кон'югованих з пероксидазою хрому. Після інкубації 60 хв за 37 °С мембрану промивали й переносили у розчин для проявлення (0,06%-й діамінобензидин, Sigma, США, та 0,001%-й пероксид водню в ЗФР).

**Конфокальна мікроскопія.** Клітинну лінію Vero, яка походить з епітелію нирки зеленої макаки (*Cercopithecus aethiops*), було отримано з банку клітинних ліній Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Клітини вирощували на накривному склі до конфлюентного стану, відмивали ЗФР. Після цього їх фіксували 40 хв, витримуючи у фіксуючому розчині (5%-й параформальдегід в 0,2 М Na-фосфатному буфері, рН 7,2). Для зв'язування scFv-антитіл клітини 60 хв витримували в розчині, що містив 150 мкл периплазматичних екстрактів

(отриманих як описано раніше [20]) та 600 мкл ТФБ. Після цього клітини промивали й витримували 1 год з антитілами до E-tag. Далі клітини знову промивали та витримували 60 хв з антитілами проти імуноглобулінів миші, міченими FITC. З метою контрастування ядер використовували Hoechst 33342. Для контролю до однієї з проб на етапі інкубації з периплазматичними екстрактами додавали 750 мкл ТФБ, до іншої — периплазматичний екстракт нетрансформованих клітин *E. coli*. Накривне скло з клітинами фіксували на предметному склі за допомогою середовища для заливки на основі полівінілового спирту (Sigma, США). Препарати аналізували за допомогою конфокального мікроскопа Carl Zeiss LSM 510 Meta. Зображення отримали з використанням 63-кратного імерсійного об'єктива (Plan-Achromat 63x/1.4 Oil DIC) від двох каналів, що фіксували флуоресценцію від FITC (фільтр 505–530 нм) та від Hoechst 33342 (фільтр 420–480 нм); збуджувальні лазери 488 нм та 405 нм, відповідно.

### Результати та обговорення

Отримання імунної бібліотеки рекомбінантних антитіл миші. HB-EGF людини та миші гомологічні на 80,8%. Тому під час імунізації мишей людським HB-EGF могли виникати побічні ефекти, пов'язані як з подоланням імунологічної толерантності, так і з можливою здатністю HB-EGF людини взаємодіяти з мишачими аналогами його рецепторів. Проте аналіз сироваток імунованих мишей показав високі рівні антитіл класу G, специфічних до цільового антигену. Разом з тим рівень антитіл до контрольних антигенів — сироваткового альбуміну

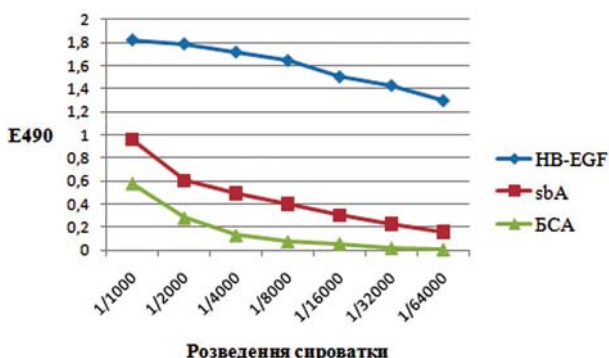


Рис. 1. Рівень антитіл класу G до цільового та контрольних антигенів у миші-донора селезінки для створення бібліотеки:

sbA — рекомбінантна субодиниця А дифтерійного токсину; БСА — сироватковий альбумін бика

бика та рекомбінантної субодиниці А дифтерійного токсину в групі імунованих sHB-EGF тварин був достатньо високим, але значно нижчим, ніж рівень антитіл до sHB-EGF (рис. 1). Подібні результати було отримано для сироваток усіх мишей, імунованих sHB-EGF, однак сироватки контрольних — неімунованих тварин із жодним з використаних антигенів не реагували (дані не наведено).

Зі спленоцитів тварини з найвищим рівнем антитіл до цільового антигену було виділено тотальну РНК (концентрація близько 1,5 мкг/мкл, відношення  $A_{260}/A_{280} = 1,7$ ). У реакції зворотної транскрипції одержали кДНК, яку використовували як матрицю для ампліфікації VH- та VL-генів. При цьому було отримано ПЛР-продукти, розміри яких відповідали очікуванім (рис. 2).

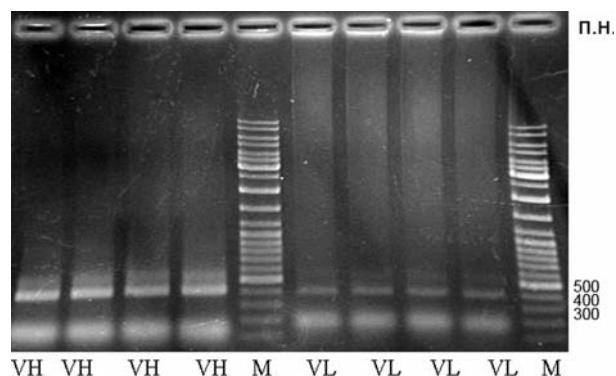


Рис. 2. Ампліфікація послідовностей VH- та VL-генів: M — маркери

VH- та VL-гени об'єднували методом SOE-ПЛР. Для цього у послідовності всіх смислових VH-праймерів та антисмислових VL-праймерів було введено по 33 додаткові нуклеотиди, що утворюють ділянки, частково комплементарні одна одній. Ці ділянки разом формують лінкер, який кодує послідовність  $(Gly_4Ser)_3$ . Для об'єднання брали очищені VH- та VL-фрагменти (рис. 3, А). У результаті реакції SOE-ПЛР було отримано фрагменти, що за розміром відповідають scFv (~800 п. н.). На електрофореграмі також присутні смуги, що відповідають V-фрагментам, які не прореагували (рис. 3, Б).

ДНК scFv та вектора обробляли ендонуклеазами рестрикції й об'єднували за допомогою T4 ДНК лігази (рис. 4). Отриманою лігазною сумішшю трансформували клітини штаму XL1-blue. Таким чином було одержано бібліотеку імуноглобулінових генів миші представленистю  $8,5 \cdot 10^5$  індивідуальних клонів.

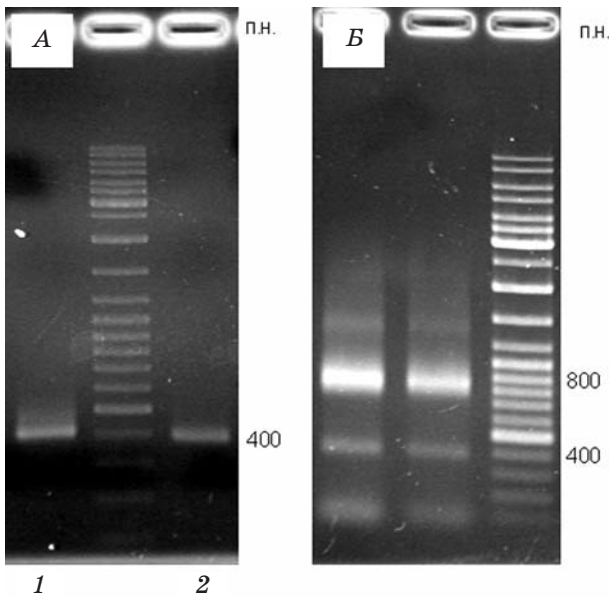


Рис. 3. А — очищені VH-(1) та VL-(2) послідовності; Б — продукт SOE-ПЛР

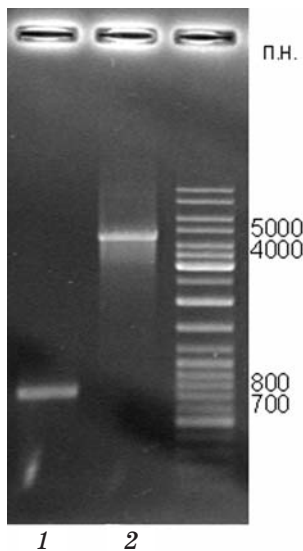


Рис. 4. А — scFv (1) і pCANTAB-5E (2), гідролізовані ендонуклеазами рестрикції *SfiI* та *NotI*

Селекція scFv-антитіл, специфічних до HB-EGF. Спершу було проведено селекцію за схемою I. Проте жоден з отриманих клонів не виявився високоспецифічним до sHB-EGF, а отже, не був придатний для подальшого використання.

Можна припустити, що труднощі під час відбору антитіл зумовлені природою антигену, адже, як вже зазначалось, HB-EGF людини та миші мають високу гомологію. Слід також зазначити, що всі описані гібридоми-продуценти моноклональних антитіл до HB-EGF отримано на мишах, нокаутних за геном HB-EGF [16–18].

Щоб виділити високоспецифічні до sHB-EGF scFv-антитіла, ми розробили модифіковану схему селекції (схема II). Було проведено три раунди відбору, під час яких для блокування фагових частинок використовували і знежирене молоко, і сироватковий альбумін бика, а пул фагів перед інкубацією із sHB-EGF виснажували на іншому рекомбінантному протеїні. У кожен з раундів брали по  $10^{14}$  фагових частинок, що забезпечило високу конкуренцію за зв'язування з антигеном. Після першого раунду було відібрано  $6 \cdot 10^4$ , після другого —  $1,2 \cdot 10^5$ , після третього раунду —  $1,7 \cdot 10^8$  фагових частинок.

144 з отриманих колоній досліджували методом Lift Assay. При цьому більшість колоній були позитивними (рис. 5). 37 із позитивних клонів протестували методом імуноензимного аналізу. Усі досліджені scFv-антитіла розпізнавали цільовий антиген — sHB-EGF і не реагували з контрольним — сироватковим альбуміном бика.

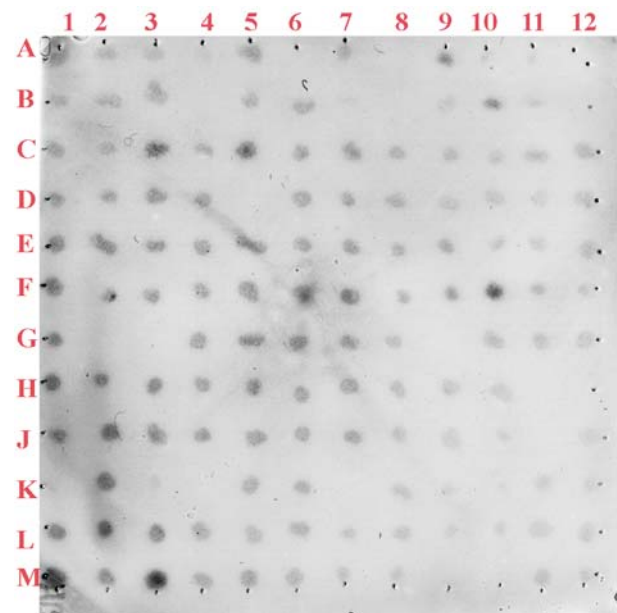


Рис. 5. Lift Assay 144 колоній, отриманих після селекції за схемою II

Аналіз гетерогенності відібраних клонів. Під час проведення кількох раундів селекції частка позитивних клонів зростає. Але, оскільки на кожному етапі відбувається розмноження та відбір фагів, які несуть scFv, специфічні до цільового антигену, існує висока вірогідність того, що різні клони, ідентифіковані після селекції як позитивні, можуть виявитись копіями одного й того самого клону. Оцінити унікальність відібраних послідовностей можна або

провівши їх секвенування, або за допомогою аналізу поліморфізму рестриктних фрагментів. Останній є більш прийнятним для скринінгу великої кількості колоній. Суть методу полягає в тому, що ДНК різних клонів обробляють ендонуклеазою рестрикції, сайт для якої є достатньо поширеним (ми використали рестриктазу *MvaI*, що має сайт рестрикції 5'-C C^A G G-3'). Отримані рестриктні фрагменти розділяють у гелі й порівнюють: якщо вони відрізняються, то це свідчить про відмінність у їхніх нуклеотидних послідовностях.

За результатами рестриктного аналізу ДНК можна виділити дві групи клонів: група I — 5A, 6A, 2C, 3C, 7C, 3D, 6D, 2E, 6E, 4F, 4G, 2G, 3F, 3E, 7D, 4D, 5C, 4C, 3B; група II — 7F, 1F, 7E, 5E, 1D, 6C, 6B, 4B, 1B, 3A, 2A, 4A, 2B, 5B, 7B, 4E, 6F, 1G (рис. 6). Для подальшої характеристики з кожної групи довільним чином було вибрано по одному представникові (клон 5A — із першої та 7E — з другої групи).

**Характеристика scFv-антитіл 5A та scFv-антитіл 7E.** Передусім було проведено імуноблотинг периплазматичних екстрактів клітин клонів 5A та 7E з використанням моноклональних антитіл до злитого із scFv E-tag. Для обох клонів виявлено специфічний продукт з очікуваною молекулярною масою — близько 33 кДа (рис. 7). Це свід-

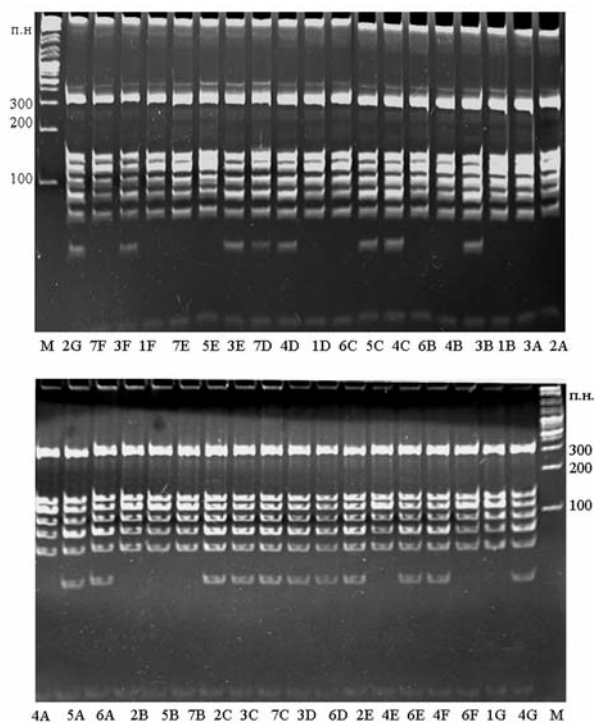


Рис. 6. Рестриктний аналіз ДНК-послідовностей scFv-антитіл, відібраних за схемою селекції II

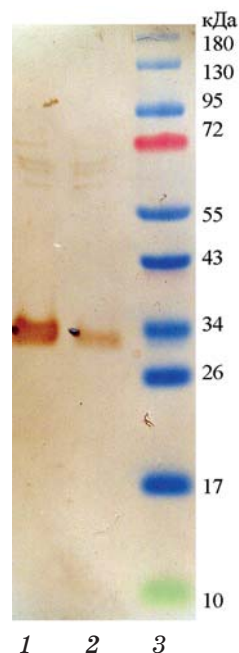


Рис. 7. Імуноблотинг периплазматичних екстрактів клітин клонів 5A та 7E з використанням моноклональних антитіл до злитого з scFv E-tag:

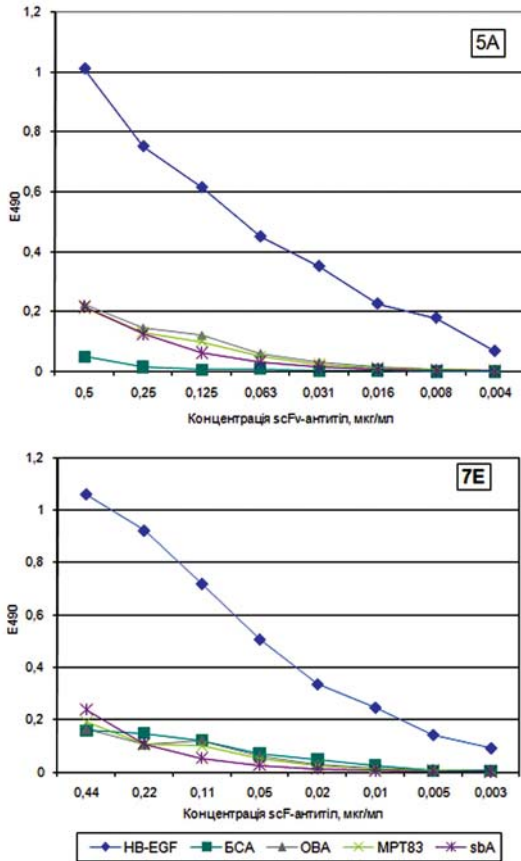
- 1 — периплазматичний екстракт клону 7E;
- 2 — периплазматичний екстракт клону 5A;
- 3 — маркери

чить про те, що scFv синтезуються у повно-розмірній формі й не деградують під час виділення.

Аби підтвердити, що виділені клони є високоспецифічними до НВ-EGF, було проаналізовано їх взаємодію з низкою контрольних антигенів методом імуноензимного аналізу. Підтверджено, що scFv-антитіла 5A та 7E розпізнають sНВ-EGF і не реагують із контрольними антигенами — сироватковим альбуміном бика, овальбуміном та рекомбінантними аналогами мікобактеріального антигену МРТ83 й субодиниці А дифтерійного токсину (рис. 8).

Константа афінності для антитіл обох клонів становила близько  $5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ .

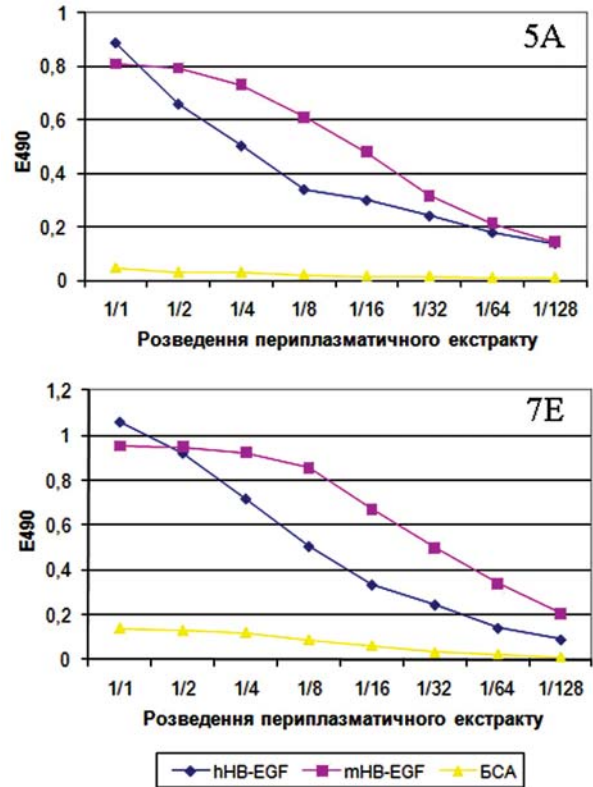
Більшість описаних на сьогодні моноклональних гібридомних антитіл до НВ-EGF розпізнають НВ-EGF і людини, і миші [19]. Щоб перевірити відібрані scFv-антитіла 5A та scFv-антитіла 7E за цим параметром, здійснено їх імуноензимний аналіз із рекомбінантними аналогами розчинної форми НВ-EGF миші і людини. Встановлено, що антитіла розпізнають обидва антигени (рис. 9). Отже, отримані нами scFv-антитіла можна використовувати для виявлення як НВ-EGF людини, так і його мишачого аналога, що



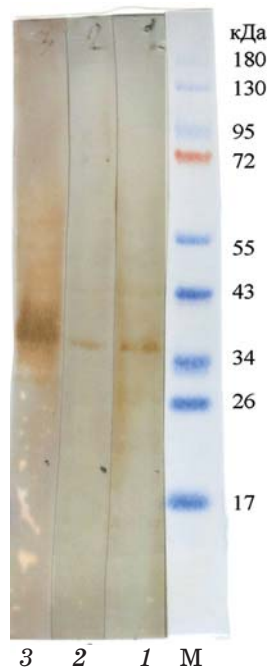
**Рис. 8.** Зв'язування scFv-антитіл клону 5А та 7Е із цільовим та контрольним антигенами: hHB-EGF — рекомбінантний аналог розчинної форми HB-EGF; BSA — сироватковий альбумін бика; OVA — овальбумін; MPT83 — рекомбінантний аналог мікобактеріального антигену MPT83; sbA — рекомбінантний аналог субодиниці А дифтерійного токсину (результати відображають один із серії експериментів)

може бути важливим у разі, коли властивості та функції HB-EGF вивчають на моделі мишей.

Також досліджено здатність отриманих антитіл виявляти HB-EGF не лише в сорбційному імуноензимному аналізі, але й в імуноблотингу. Для цього застосовували лізат клону-продуцента рекомбінантного HB-EGF. Як позитивний контроль брали антитіла проти злитого з HB-EGF His-tag. Виявилось, що обидва клони scFv-антитіл не розпізнають HB-EGF у лізаті клону-продуцента за умови проведення електрофорезу у відновлювальних умовах (з додаванням до зразків 5% -го β-меркаптоетанолу). Однак за відсутності у зразках реагенту для відновлення дисульфідних зв'язків обидва клони антитіл виявляли смугу HB-EGF (рис. 10). Одержані результати опосередковано вказу-



**Рис. 9.** Зв'язування scFv-антитіл клону 5А та 7Е із HB-EGF людини та миші: hHB-EGF — рекомбінантний аналог розчинної форми HB-EGF людини; mHB-EGF — рекомбінантний аналог розчинної форми HB-EGF миші; BSA — сироватковий альбумін бика (результати відображають один із серії експериментів).



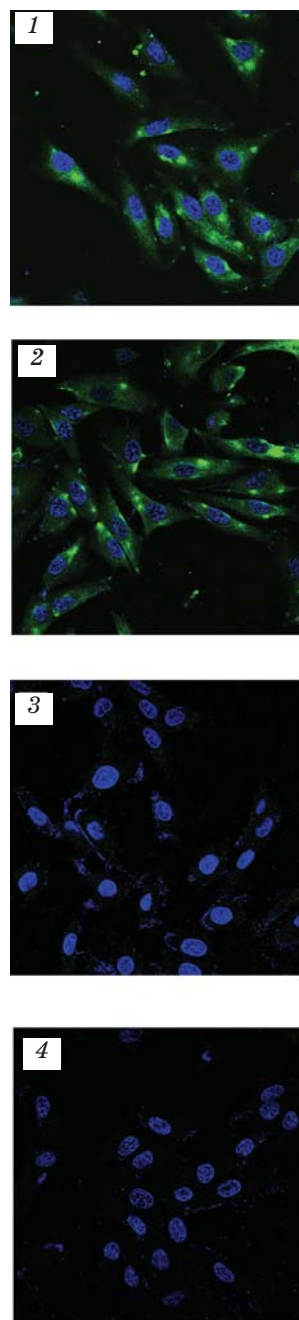
**Рис. 10.** Імуноблотинг клітинного лізату клону-продуцента sHB-EGF з використанням: 1 — периплазматичного екстракту клону 5А; 2 — клону 7Е; 3 — антитіл до His-tag; М — маркери

ють на те, що в утворенні епітопу, до якого специфічні scFv 5A та 7E, беруть участь дисульфідні зв'язки, присутні в молекулі HB-EGF у межах EGF-домену.

Також було продемонстровано, що відібрані scFv-антитіла здатні зв'язувати HB-EGF безпосередньо на поверхні клітин. Для дослідження використовували клітини лінії Vero, що є класичною моделлю клітин з високою експресією HB-EGF. Взаємодію scFv-антитіл з клітинами лінії Vero вивчали методом конфокальної мікроскопії. Перед забарвлюванням клітини фіксували, щоб запобігти ендоцитозу HB-EGF після зв'язування з scFv-антитілами. Для виявлення scFv-антитіл, зв'язаних на поверхні клітин, використовували моноклональні антитіла, специфічні до E-tag, злитого із scFv-антитілами, та мічені FITC антитіла до імуноглобулінів миші. Як видно з рис. 11, обидва клони scFv-антитіл зв'язувались із HB-EGF на поверхні клітин лінії Vero.

Таким чином, у результаті проведеної роботи було отримано рекомбінантні scFv-антитіла, специфічні до HB-EGF, який є важливим регулятором низки фізіологічних та патологічних процесів. Показано, що одержані антитіла можна використовувати в сорбційному імуноензимному аналізі, імуноблотингу та в імуноцитохімії. Формат scFv розкриває можливості для їх подальшого застосування в різноманітних дослідженнях *in vivo* та *in vitro*, а також, імовірно, для створення терапевтичних і діагностичних препаратів.

Роботу виконано за підтримки Державної цільової науково-технічної програми «Нанотехнології та наноматеріали» на 2010–2014 роки.



**Рис. 11. Конфокальна мікроскопія клітин лінії Vero, забарвлених scFv-антитілами проти HB-EGF:**  
 1 — scFv-антитіла 5A; 2 — scFv-антитіла 7E;  
 3, 4 — негативний контроль. Для детекції scFv-антитіл використовували антитіла до E-tag та FITC-мічені антитіла проти імуноглобулінів миші, для контрастування ядер — Hoechst 33342



## ЛІТЕРАТУРА

1. Higashiyama S., Abraham J. A., Miller J. et al. A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF // *Science*. — 1991. — V. 251, N 4996. — P. 936–939.
2. Paria B. C., Elenius K., Klagsbrun M., Dey S. K. Heparin-binding EGF-like growth factor interacts with mouse blastocysts independently of ErbB1: a possible role for heparan sulfate proteoglycans and ErbB4 in blastocyst implantation // *Development*. — 1999. — V. 126, N 9. — P. 1997–2005.
3. Goishi K., Higashiyama S., Klagsbrun M. et al. Phorbol ester induces the rapid processing of cell surface heparin-binding EGF-like growth factor: conversion from juxtacrine to paracrine growth factor activity // *Mol. Biol. Cell*. — 1995. — V. 6, N 8. — P. 967–980.
4. Higashiyama S., Lau K., Besner G. E. et al. Structure of heparin-binding EGF-like growth factor. Multiple forms, primary structure, and glycosylation of the mature protein // *J. Biol. Chem.* — 1992. — V. 267, N 9. — P. 6205–6212.
5. Elenius K., Paul S., Allison G. et al. Activation of HER4 by heparin-binding EGF-like growth factor stimulates chemotaxis but not proliferation // *EMBO J.* — 1997. — V. 16, N 6. — P. 1268–1278.
6. Tolino M. A., Block E. R., Klarlund J. K. Brief treatment with heparin-binding EGF-like growth factor, but not with EGF, is sufficient to accelerate epithelial wound healing // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2011. — V. 1810, N 9. — P. 875–878.
7. Kim J. M., Bak E. J., Chang J. Y. et al. Effects of HB-EGF and epiregulin on wound healing of gingival cells *in vitro* // *Oral. Dis.* — 2011. — V. 17, N 8. — P. 785–793.
8. Oyagi A., Moriguchi S., Nitta A. et al. Heparin-binding EGF-like growth factor is required for synaptic plasticity and memory formation // *Brain. Res.* — 2011. — V. 1419. — P. 97–104.
9. Iwamoto R., Mekada E. ErbB and HB-EGF signaling in heart development and function // *Cell. Struct. Funct.* — 2006. — V. 31, N 1. — P. 1–14.
10. Jessmon P., Leach R. E., Armant D. R. Diverse functions of HBEGF during pregnancy // *Mol. Reprod. Dev.* — 2009. — V. 76, N 12. — P. 1116–1127.
11. Miyamoto S., Yagi H., Yotsumoto F. et al. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as a new target molecule for cancer therapy // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2008. — V. 622. — P. 281–295.
12. Kuo P. L., Huang M. S., Cheng D. E. et al. Lung cancer-derived galectin-1 enhances tumorigenic potentiation of tumor-associated dendritic cells by expressing heparin-binding EGF-like growth factor // *J. Biol. Chem.* — 2012. — V. 287, N 13. — P. 9753–9764.
13. Lue H. W., Yang X., Wang R. et al. LIV-1 promotes prostate cancer epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis through HB-EGF shedding and EGFR-mediated ERK signaling // *PLoS One*. — 2011. — V. 6, N 11. — E. 27720.
14. Murata T., Mizushima H., Chinen I. et al. HB-EGF and PDGF mediate reciprocal interactions of carcinoma cells with cancer-associated fibroblasts to support progression of uterine cervical cancers // *Cancer. Res.* — 2011. — V. 71, N 21. — P. 6633–6642.
15. Yotsumoto F., Yagi H., Suzuki S. O. et al. Validation of HB-EGF and amphiregulin as targets for human cancer therapy // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2008. — V. 365, N 3. — P. 555–561.
16. Hamaoka M., Chinen I., Murata T. et al. Anti-human HB-EGF monoclonal antibodies inhibiting ectodomain shedding of HB-EGF and diphtheria toxin binding // *J. Biochem.* — 2010. — V. 148, N 1. — P. 55–69.
17. Miyamoto S., Iwamoto R., Furuya A. et al. A novel anti-human HB-EGF monoclonal antibody with multiple antitumor mechanisms against ovarian cancer cells // *Clin. Cancer. Res.* — 2011. — V. 17, N 21. — P. 6733–6741.
18. Mine N., Iwamoto R., Mekada E. HB-EGF promotes epithelial cell migration in eyelid development // *Development*. — 2005. — V. 132, N 19. — P. 4317–4326.
19. Mekada E., Iwamoto R. HB-EGF (Mouse) // *UCSD-Nature Molecule Pages*. — 2008. — doi: 10.1038/mp.a002932.01.
20. Короткевич Н. В., Колибо Д. В., Лабинцев А. Ю. та ін. Отримання рекомбінантного аналога секреторної форми HB-EGF людини та оцінка перспектив його застосування в біотехнології // *Біотехнологія*. — 2010. — Т. 3, № 4 — С. 44–54.
21. Олійник О. С., Кабернюк А. А., Редчук Т. А. та ін. Створення імунної бібліотеки імуноглобулінових генів миші та відбір одноланцюгових Fv-антитіл, специфічних до В-субодиниці дифтерійного токсину // *Укр. біохім. журн.* — 2009. — Т. 81, № 2. — С. 60–71.
22. Okamoto T., Mukai Y., Yoshiok Y. et al. Optimal construction of non-immune scFv phage display libraries from mouse bone marrow and spleen established to select specific scFvs efficiently binding to antigen // *Biochem. and Biophys. Research Communications*. — 2004. — V. 323. — P. 583–591.
23. Bobrovnik S. A., Komisarenko S. V., Ilyina L. V. Novel and simple ELISA-based method for antibody affinity determination // *Укр. біохім. журн.* — 2005. — V. 77, N 2. — P. 169–174.

**ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА  
РЕКОМБИНАНТНЫХ  
ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫХ ВАРИАБЕЛЬНЫХ  
ФРАГМЕНТОВ АНТИТЕЛ (scFv) ПРОТИВ  
ГЕПАРИНСВЯЗЫВАЮЩЕГО  
EGF-ПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА  
ЧЕЛОВЕКА**

*Е. С. Олейник  
А. А. Кабернюк  
Д. В. Колибо  
С. В. Комисаренко*

Институт биохимии им. А. В. Палладина  
НАН Украины, Киев

*E-mail: lenaoliinyk@mail.ru*

Гепаринсвязывающий EGF-подобный фактор роста — HB-EGF, принадлежащий к EGF-семейству ростовых факторов, играет важную роль во многих физиологических и патологических процессах. Антитела являются важным инструментом для исследования функций HB-EGF при нормальных и патологических условиях. Целью этой работы было выделение и изучение некоторых свойств рекомбинантных одноцепочечных переменных фрагментов антител (scFv-антител), специфичных к HB-EGF. Для этого была сконструирована фаговая иммунная библиотека scFv-антител мыши, иммунизированной рекомбинантным человеческим растворимым HB-EGF. После скрининга библиотеки против HB-EGF выделили 2 группы клонов антител, характеризующихся разными наборами рестриктных фрагментов. По одному клону из каждой группы (scFv 5A и 7E) были охарактеризованы. Показано, что scFv из этих клонов способны связываться как с человеческим, так и с мышинным HB-EGF. Оба клона распознавали целевой антиген в вестерн-блоте, но только в нередуцирующих условиях. Методом конфокальной микроскопии было также продемонстрировано специфическое связывание scFv 5A и 7E с клетками линии Vero, характеризующейся высоким уровнем HB-EGF на поверхности клетки.

Таким образом, получены scFv-антитела против растворимого HB-EGF, пригодные для разных видов иммунохимического анализа, в частности для использования в сорбционном иммуноэнзимном анализе, иммуноблоттинге и иммуноцитохимии. Возможно, такие scFv-антитела могут быть использованы в исследованиях HB-EGF, а также для разработки новых диагностических и терапевтических средств.

**Ключевые слова:** гепаринсвязывающий EGF-подобный фактор роста, scFv-антитела, фаговый дисплей.

**ISOLATION AND CHARACTERISATION  
OF RECOMBINANT SINGLE CHAIN  
VARIABLE FRAGMENT ANTIBODIES  
(scFv) AGAINST HUMAN HEPARIN-  
BINDING EGF-LIKE GROWTH FACTOR**

*O. S. Oliinyk  
A. A. Kaberniuk  
D. V. Kolibo  
S. V. Komisarenko*

Palladin Institute of Biochemistry  
of National Academy of Sciences of Ukraine,  
Kyiv

*E-mail: lenaoliinyk@mail.ru*

Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) is a member of the EGF family of growth factors, which plays an important role in many physiological and pathological processes. Antibodies are an important tool for investigation of HB-EGF functions at normal and pathological processes. The aim of this study was to obtain and to study some properties of recombinant single-chain variable fragment (scFv) antibodies specific to HB-EGF. For this purpose a phage-displayed immune library of mice immunized with recombinant human soluble HB-EGF was generated. The library was screened against HB-EGF, and 2 groups of antibody clones with different fingerprinting patterns were isolated. Two clones — one from each group (scFv 5A and scFv 7E) were analyzed. It was shown that these scFv antibodies could bind both human and mouse HB-EGF. Both clones recognized target antigen in Western blot, but only under non-reducing conditions. Specific binding of scFv 5A and scFv 7E to Vero cells with high level of HB-EGF on their surface was also demonstrated by confocal microscopy.

In this study scFv antibodies against soluble HB-EGF were obtained. They were suitable for ELISA, Western blot and immunocytochemistry applications. These scFv could be further used as a tool in HB-EGF research and, possibly, for the development of new diagnostic and therapeutic agents.

**Key words:** heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor, scFv-antibodies, phage display.