

DOI 10.18699/vjgb-24-29


Проблемы создания фаговых библиотек антител и пути их решения

В.С. Арипов , Н.В. Волкова , А.А. Ильичев , Д.Н. Щербаков Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия
 aripov_vs@vector.nsc.ru

Аннотация. Фаговый дисплей стал эффективной, надежной и востребованной молекулярной техникой для создания библиотек, содержащих миллионы или даже миллиарды клонов, экспонирующих различающиеся пептиды или белки. В основе этого метода лежит соответствие между генотипом и фенотипом фага, обеспечивающее презентацию на поверхности фаговых частиц рекомбинантных белков с известным аминокислотным составом. Использование процедуры аффинной селекции позволяет проводить отбор из фаговых библиотек вариантов, обладающих сродством к различным мишеням. Внедрение технологии фагового дисплея антител имело революционное значение в области клинической иммунологии, как для создания инструментов диагностики инфекционных заболеваний, так и для получения терапевтических агентов. Она стала также основной эффективной и относительно недорогой методикой исследования белок-белковых взаимодействий, сайтов связывания рецепторов, идентификации эпитопов и мимотопов. Технология фагового дисплея антител включает в себя ряд этапов, от успешной реализации которых зависит финальный результат. Основа любой библиотеки – разнообразие, природное или полученное при помощи методов комбинаторной химии. Критически важным является подбор молекулярных техник, обеспечивающих сохранение этого разнообразия на этапе получения библиотек фагмидов и на этапе трансформации клеток *E. coli*. После добавления фага-помощника к суспензии трансформированных клеток *E. coli* происходит формирование библиотеки бактериофагов, которая служит рабочим инструментом для проведения процедуры аффинной селекции и поиска индивидуальных молекул. Несмотря на кажущуюся простоту создания фаговых библиотек антител, существует ряд тонкостей, которые необходимо учитывать. В первую очередь это особенности подготовки фагмидного вектора. В настоящее время разработано большое количество фагмидных векторов, и их выбор также имеет большое значение. Ключевым этапом считается подготовка компетентных клеток *E. coli* и технология их трансформации. Немаловажен выбор фага-помощника и способа его подготовки. Статья посвящена основным проблемам, с которыми сталкиваются исследователи при создании фаговых библиотек антител. Ключевые слова: фаговая библиотека; репликативная форма бактериофага; моноклональные антитела; фаг-помощник; компетентные клетки.

Для цитирования: Арипов В.С., Волкова Н.В., Ильичев А.А., Щербаков Д.Н. Проблемы создания фаговых библиотек антител и пути их решения. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(2):249-257. DOI 10.18699/vjgb-24-29

Problems of creating antibody phage libraries and their solutions

V.S. Aripov , N.V. Volkova , A.A. Ilyichev , D.N. Shcherbakov State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia
 aripov_vs@vector.nsc.ru

Abstract. Phage display has become an efficient, reliable and popular molecular technique for generating libraries encompassing millions or even billions of clones of divergent peptides or proteins. The method is based on the correspondence between phage genotype and phenotype, which ensures the presentation of recombinant proteins of known amino acid composition on the surface of phage particles. The use of affinity selection allows one to choose variants with affinity for different targets from phage libraries. The implementation of the antibody phage display technique has revolutionized the field of clinical immunology, both for developing tools to diagnose infectious diseases and for producing therapeutic agents. It has also become the basis for efficient and relatively inexpensive methods for studying protein-protein interactions, receptor binding sites, as well as epitope and mimotope identification. The antibody phage display technique involves a number of steps, and the final result depends on their successful implementation. The diversity, whether natural or obtained by combinatorial chemistry, is the basis of any library. The choice of molecular techniques is critical to ensure that this diversity is maintained during the phage library preparation step and during the transformation of *E. coli* cells. After a helper phage is added to the suspension of transformed *E. coli* cells, a bacteriophage library is formed, which is a working tool for performing the affinity selection procedure and searching for individual molecules. Despite the apparent simplicity of generating phage antibody libraries, a number of subtleties need to be taken into account. First, there are the features of phage vector preparation. Currently, a large number of phagemid vectors have been developed, and their selection is also of great

importance. The key step is preparing competent *E. coli* cells and the technology of their transformation. The choice of a helper phage and the method used to generate it is also important. This article discusses the key challenges faced by researchers in constructing phage antibody libraries.

Key words: phage library; bacteriophage replicative form; monoclonal antibodies; helper phage; competent cells.

For citation: Aripov V.S., Volkova N.V., Ilyichev A.A., Shcherbakov D.N. Problems of creating antibody phage libraries and their solutions. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(2):249-257. DOI 10.18699/vjgb-24-29

Введение

В 1985 г. Smith впервые описал технологию фагового дисплея, продемонстрировав, что нитчатые фаги способны экспонировать интересующий пептид на своей поверхности после вставки чужеродного фрагмента ДНК в ген белка оболочки (Smith, 1985). Впоследствии Parmley и Smith описали процесс селекции и обогащения фаговых библиотек на основе аффинного связывания, получивший название «биоэ́ннинг» (Parmley, Smith, 1988). А в 1991 г. McCafferty и Winter первыми применили технологию фагового дисплея для получения антител, создав их комбинаторные библиотеки с помощью нитчатых бактериофагов, которые использовались для поиска антиген-специфических моноклональных антител (McCafferty et al., 1990).

Основными инструментами технологии фагового дисплея стали нитевидные бактериофаги M13, f1, fd. Они стабильны в различных растворах, в том числе при экстремальных значениях pH и высокой температуре (Brigati, Petrenko, 2005), а также малочувствительны к литическим ферментам (включая ДНКазы и протеазы) (Larocca et al., 2002).

Нитчатый бактериофаг M13 (рис. 1) – один из наиболее используемых бактериофагов для фагового дисплея антител (Sokullu et al., 2019). Фаг M13 обладает высокой способностью к репликации, а в его геноме методами генетической инженерии можно встраивать большие чужеродные фрагменты ДНК. Этот бактериофаг является нелитическим, инфицирует и размножается в штаммах *Escherichia coli*, несущих F+, которые формируют половые ворсинки (O’Callaghan et al., 1973). Основная масса вириона состоит из одноцепочечной ДНК, покрытой пятью копиями основного белка оболочки pVIII. Каждый из концов фага сформирован пятью копиями двух различных белков: pVII и pIX – на одном

конце, pIII и pVI – на другом (см. рис. 1). Длина вириона зависит от длины упакованного в фаговую частицу генома. При этом к геному дикого типа могут быть добавлены до 12000 нуклеотидов без нарушения упаковки фага (Rasched, Oberer, 1986).

В ходе репликативного цикла нитчатых бактериофагов их геном в бактериальной клетке одновременно присутствует в виде большого числа копий репликативной формы (двухцепочечная кольцевая) и одноцепочечной ДНК (ssDNA). Присутствие ssDNA в образце ДНК мешает проведению клонирования, поскольку создает «фон» из клонов, не имеющих встройку целевого гена. Используя очищенную репликативную форму, можно осуществить клонирование фрагментов ДНК в составе участков, кодирующих интересующий белок бактериофага (в основном это белки pIII и pVIII). Такие векторные системы обозначаются как системы 3 и 8 соответственно (Kay et al., 1996).

Основные различия при использовании белков pIII и pVIII заключаются в длине чужеродных пептидов, а также в представленности химерных белков на поверхности фагов-потомков и влиянии на их жизнеспособность (Ильичев и др., 1989; Bass et al., 1990; Barbas et al., 1991). По сравнению с белком pVIII, белок pIII может обеспечивать дисплей более протяженных аминокислотных последовательностей (Näkelä et al., 1978). Для небольших пептидов принято использовать систему с белком pVIII. Более крупные полипептиды влияют на функцию белка pVIII, поэтому для них используют систему с белком pIII. Из-за структурных свойств фагов Ff использование в системе фагового дисплея белка pIII приводит к включению менее пяти копий слитых белков в фагах-потомках. Только при отсутствии гена pIII в геноме фага-помощника в фагах-потомках будут присутствовать пять копий этого белка (Smith, 1993).

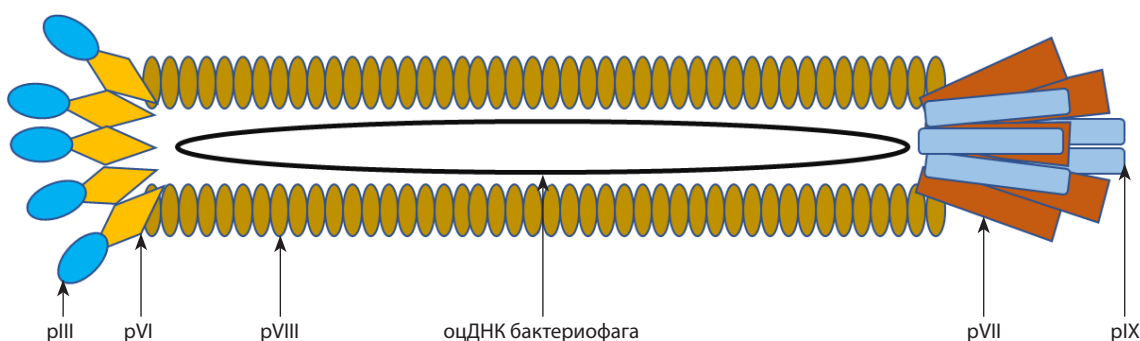


Рис. 1. Схематическое изображение нитчатого бактериофага M13.

Нитчатый фаг M13 имеет размер около 880 нм в длину и 6.5 нм в ширину, кольцевую одноцепочечную ДНК. Капсид бактериофага M13 образован пятью копиями различных минорных оболочечных белков (pIII, pVI, pVII, pIX), однако большую часть его капсида составляет мажорный оболочечный белок pVIII, представленный ~2700 копиями (Chung et al., 2011).

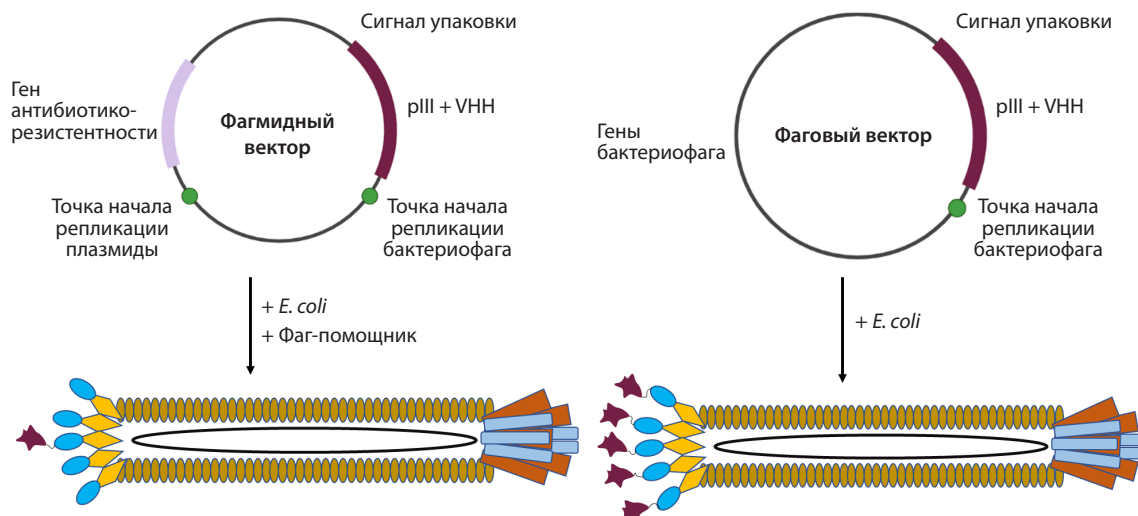


Рис. 2. Отличие фaгмиды от фaгового вектора.

Использование рVIII позволяет получать фаговые частицы, включающие намного больше, чем пять, копий химерных белков – сотни или даже тысячи (Veronese et al., 1994). Однако из-за множественных копий химерных белков заметную роль начинает играть эффект avidности, что может затруднить отбор вариантов белков с отличающейся аффинностью. Поэтому рVIII используют в фаговом дисплее, чтобы расширить круг потенциальных лигандов, а рIII – для уменьшения или устранения эффекта avidности для селекции высокоаффинных белков. Кроме того, N-концевой домен белка оболочки рIII участвует в инфицировании клеток-хозяев. Чтобы заразить *E. coli*, нитчатые фаги используют нитевидные бактериальные структуры, известные как F-пили. Концевая часть фага с белком рIII взаимодействует с белком TolA на бактериальной поверхности. Несмотря на то что белок рIII обладает относительно большими размерами, чрезмерное вмешательство в его структуру может приводить к нарушению его взаимодействия с белками F-пилей. Это может оказывать значительное влияние на жизнеспособность фагов потомков, поэтому использование белка рIII для дисплея фрагментов белков имеет ограничение. В случае белка рVIII подобные проблемы отсутствуют.

Что касается других белков бактериофага, то до сих пор опубликовано лишь несколько работ, в которых сообщалось о возможности использования белков рVII и рIX (Gao et al., 1999, 2002). Белки рVII и рIX образуют комплекс на конце фаговой частицы, противоположному концу, несущему широко используемый белок рIII. Для демонстрации возможности использования этих белков для дисплея был разработан вариант фaгмиды, в котором переменные области тяжелой и легкой цепей антител слиты с N-концами рVII и рIX соответственно. Примечательно, что слитые белки взаимодействуют с образованием функционального Fv-связывающего домена на поверхности фага. Данный подход выглядит перспективным для дисплея комплексных библиотек пептидов и белков, которые могли бы формировать комбинаторные гетеродимерные структуры Fv-области антитела, однако он не получил широкого распространения.

Помимо фаговых векторов, для создания библиотек используют фaгмиды. Фaгмиды – это векторные молекулы, сочетающие свойства плазмиды и фагового вектора (Kau et al., 1996). Главное их отличие от фаговых векторов заключается в том, что фaгмиды представляют собой векторы, полученные из Ff-фага, содержащие точку начала репликации (ori) плазмиды для двуцепочечной репликации и упаковку в фаговые частицы (рис. 2). Они обычно не кодируют или кодируют только один вид белков оболочки, тогда как другие структурные и функциональные белки, необходимые для завершения жизненного цикла бактериофага, предоставляются фагом-помощником (Ledsgaard et al., 2018).

Альтернативный подход предложен Chasteen и его командой, разработавшими «линии бактериальных упаковывающих клеток», которые содержат хелперные плазмиды на основе M13 (Chasteen et al., 2006). Наличие этих клеток обеспечивает синтез белков упаковки фага, которые собирают фаговые частицы так же эффективно, как и при заражении фагом-помощником; тем самым исключается стадия заражения бактериальных клеток фагом-помощником.

В фaгмиды вводят и другие элементы, такие как молекулярные метки и селективные маркеры, для облегчения последующих операций, например очистки белков. Также могут быть введены метки для упрощения скрининга библиотеки.

Небольшой размер фaгмид позволяет клонировать в их составе более крупные фрагменты генов, кодирующие слитые белки. Эффективность трансформации фaгмидами выше, чем фаговыми векторами, что позволяет конструировать библиотеки с большим репертуаром (Qi et al., 2012).

Существует огромное количество вариантов фaгмид. С фaгмидами типов III и VIII можно ознакомиться подробнее в обзоре (Qi et al., 2012). Наиболее популярными являются фaгмиды рHEN, рComb, рSEX, рADL, у каждой из которых есть несколько производных. Каждая фaгмида представляет собой оригинальную конструкцию, выбор которой зависит от цели исследователя. Например, фaгми-

да рADL-10b имеет fl ori для включения одноцепочечной репликации и упаковки в фаговые частицы, копию LacI для обеспечения репрессии lac промотора с сильным терминатором транскрипции для предотвращения нежелательной и токсичной экспрессии во время клонирования. Такая конструкция обеспечивает надежное клонирование переменных генов антител и повышение стабильности библиотеки во время скрининга (Krebbet et al., 1997). Этот вектор рекомендуется для дисплея scFv и лучше всего подходит, когда предполагается этап повторного клонирования для синтеза белка в растворимой форме.

Включение амбер стоп-кодона (TAG) между целевым белком и белком оболочки фага инициирует экспрессию слитого белка в супрессорных штаммах *E. coli*, таких как TG1. При этом кодон TAG будет транслироваться как остаток глутамина. Однако в несупрессорных штаммах, например HB2151, будет продуцироваться растворимая форма рекомбинантного белка, поскольку в таких штаммах не будут включать глутамин в амбер стоп-кодон. В данном случае TAG будет обычным стоп-кодоном (Hoogenboom et al., 1991).

Уровень экспрессии, обеспечиваемый фагидами серии рADL, эквивалентен уровню экспрессии фагмид рComb3 и значительно ниже, чем у фагмид рHEN. Чрезмерная экспрессия приводит к токсичности, что делает библиотеки антител генетически нестабильными и способствует сильному смещению в сторону потери разнообразия. В этом отношении фагмиды серии рADL обеспечивают хороший баланс между токсичностью и синтезом целевых антител в периплазматическом пространстве в штаммах бактерий (Ishina et al., 2020).

Наиболее популярным производным вектора рComb является рComb3XSS. Он содержит два сайта гидролиза рестриктазы SfiI, узнающей последовательность GGCC NNNNNGGCC. Отсутствие специфичности в отношении пяти центральных пар нуклеотидов позволяет проводить встройку ПЦР продуктов, кодирующих фрагменты антител, в необходимой ориентации. Направленность ориентации определяется дизайном прямого и обратного праймеров, тоже содержащих сайт SfiI. Вектор Comb3XSS также содержит метки 6×His и HA, с помощью которых можно проводить очистку и обнаружение белков, и имеет амбер стоп-кодон для выключения экспрессии слитого белка рIII путем переключения на несупрессорный штамм *E. coli*, позволяющий производить растворимый белок без субклонирования.

Ключевыми моментами в работе с фаговыми библиотеками являются подготовка вектора, приготовление клеток с хорошей компетентностью, проведение электропорации, а также амплификация фага-помощника. Ниже рассмотрен каждый из этих пунктов и даны некоторые рекомендации.

Подготовка фагмиды

Один из определяющих моментов получения фаговых библиотек – подготовка вектора для встройки целевых последовательностей ДНК. Основная сложность заключается в очистке препарата фагмидной ДНК от одноцепочечной и линейной форм ДНК. Эти формы ДНК создают «фон» на контрольной чашке при электропорации, что

затрудняет оценку «представленности» фаговой библиотеки. Самое главное, что они могут оказывать негативное влияние на уровень разнообразия библиотеки. Для решения этой проблемы используют различные протоколы очистки фагмидной ДНК. После того, как ДНК выделили, можно очистить препарат от одноцепочечной и линейной формы с помощью фенольного способа. Данный метод является классическим, однако имеет ряд недостатков, таких как большие потери репликативной формы ДНК. Также для работы с фенолом нужны специальные условия; нередко выделение ДНК фенольным методом зависит от мастерства исполнителя (Маниатис и др., 1984).

Существует метод выделения репликативной формы ДНК фага с помощью ацетата аммония. Этот метод не требует особых условий работы, в отличие от фенольного способа, но достаточно затратен по времени (Маниатис и др., 1984).

Альтернативой является очистка препарата ДНК с помощью сорбентов, например с использованием сорбента HiTrap PlasmidSelect Xtra. Основные этапы очистки ДНК с помощью сорбента представлены на рис. 3.

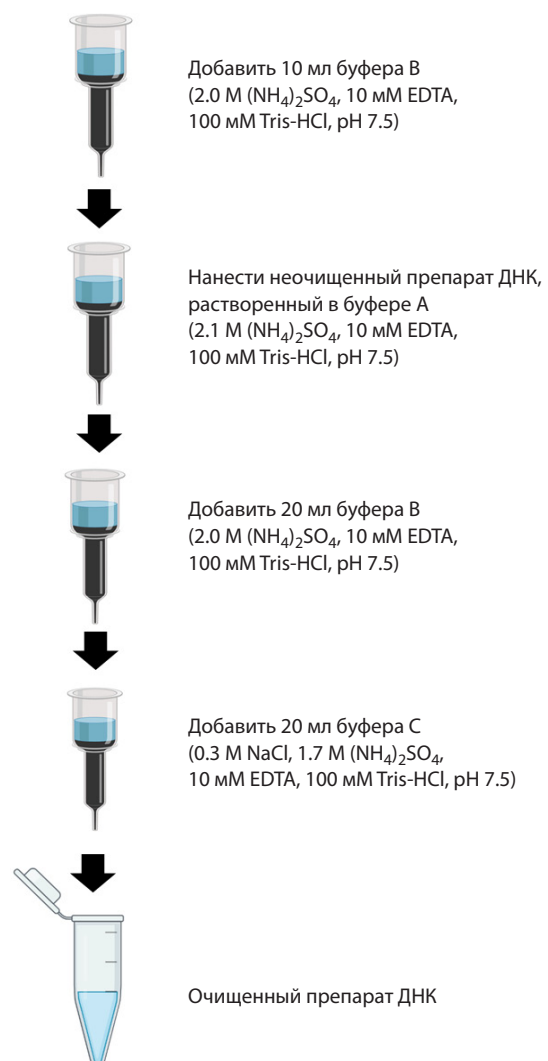


Рис. 3. Схема очистки фагового вектора от одноцепочечной и линейной форм ДНК.

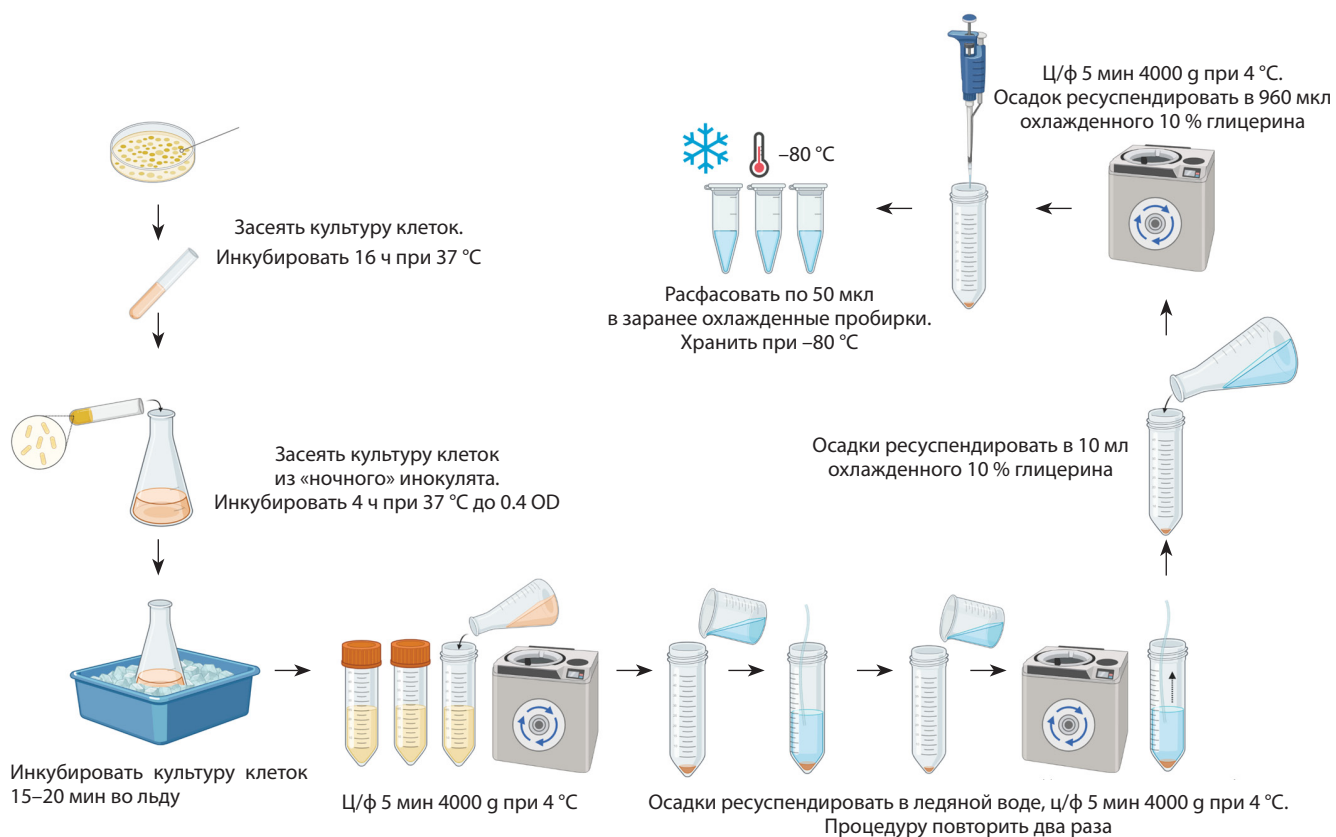


Рис. 4. Типичная схема получения компетентных клеток.

Данный метод тоже неидеален, однако он не требует особых условий для выполнения процедуры очистки. После очистки на сорбенте надо быть готовым к большим потерям ДНК. В лучшем случае выход от общего количества ДНК будет составлять 10 %. В то же время такого количества ДНК, очищенной от сателлитных форм, вполне достаточно для получения фаговой библиотеки.

Компетентные клетки

Наличие клеток, обладающих высокой компетентностью, является принципиальным моментом получения фаговой библиотеки, обладающей высокой представленностью. Одной из лучших клеточных линий для получения больших библиотек фагов считаются клетки TG1 (Tu et al., 2005; Chai et al., 2020). Это производные штамма *E. coli* JM101, который не имеет модификации. В настоящее время TG1 – одни из самых быстрорастущих клонов *E. coli*, что, несомненно, играет важную роль в постановке эксперимента.

Существуют коммерческие компании, предоставляющие готовые клетки с компетентностью $\geq 4 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мкг ДНК. Однако поставка таких клеток не всегда возможна, а процесс транспортировки приводит к колебаниям температуры, что снижает компетентность клеток. Поэтому разработка протокола получения высокоэффективных клеток для создания фаговых библиотек антител является принципиальной задачей (рис. 4).

Чтобы получить большое разнообразие фаговой библиотеки (10^{10-11} КОЕ), необходимо учитывать простые,

но важные условия в подготовке компетентных клеток. Прежде всего, это соблюдение условий культивирования, особенно температуры. Рекомендуемая температура составляет +37 °С. Также необходимо следить, чтобы плотность культуры клеток не превышала значения 0.4 OD. Клетки должны находиться в начальной – средней логарифмической фазе роста. Использование клеток в поздней логарифмической или стационарной фазе значительно уменьшает эффективность электропорации. Очень важно не допускать перепада температур. После того, как ваша культура доросла до заданной плотности, все манипуляции надо проводить в «мокро» льду.

Также необходимо аккуратно ресуспендировать клетки на каждой из стадий, поскольку клетки очень чувствительны и легко подвержены разрушению. Полученные клетки рекомендуется хранить при –80 °С (Chai et al., 2020), при этой температуре они дольше сохраняют компетентность. Однако следует учитывать, что компетентность клеток со временем становится хуже, поэтому для сохранения разнообразия фаговых библиотек необходимо использовать свежеприготовленные клетки.

Электропорация

Перед проведением электропорации (рис. 5) при создании фаговой библиотеки оценивают эффективность полученных клеток с использованием ДНК плазмиды pUC19 с известной концентрацией (Chai et al., 2020).

Перед началом электропорации необходимо разморозить компетентные клетки во льду. Данная манипуля-

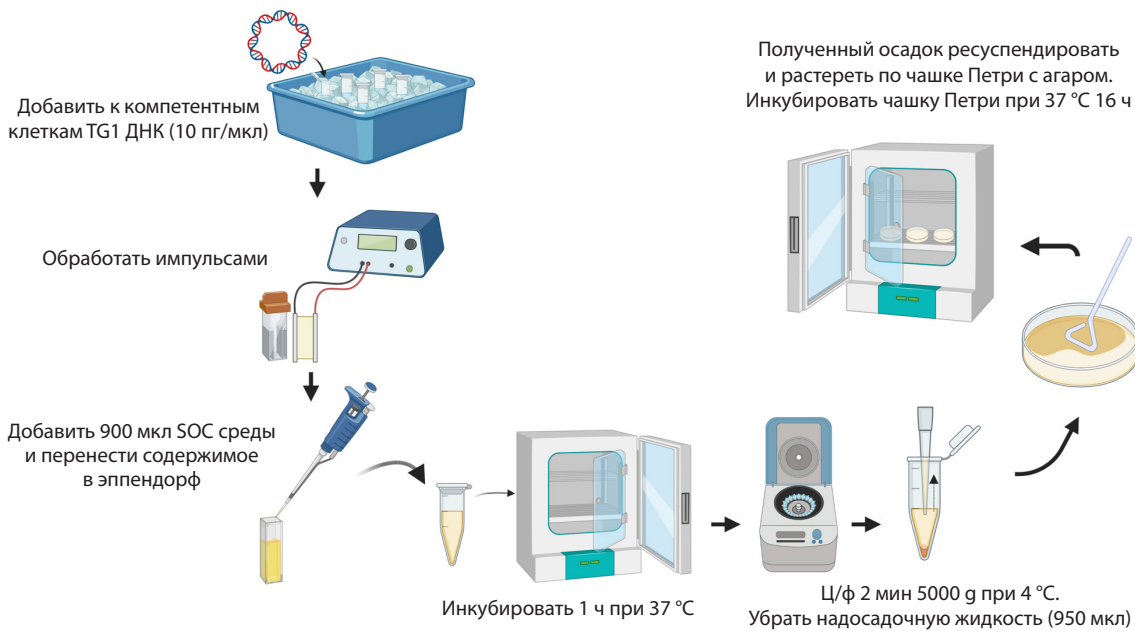


Рис. 5. Схема проведения электропорации.

ции позволит сохранить жизнеспособность клеток. Параллельно с размораживанием клеток прогреваем любую питательную среду до +37 °С.

Манипуляции следует проводить четко и быстро. Сначала добавляем 1 мкл ДНК (10 пг/мкл). Такое количество необходимо для контрольной плазмиды pUC19 к предварительно замороженным электрокомпетентным клеткам. При проведении электропорации с лигазной смесью, надо брать намного больше ДНК, в 15–25 раз (Pardon et al., 2014).

Важно также контролировать напряжение в соответствии с размером кюветы. После электрического импульса необходимо сразу добавить 1 мл восстанавливающей SOC среды и инкубировать клетки без перемешивания в термостате при +37 °С в течение 1 ч. После инкубации надо центрифугировать трансформированные клетки, убрать 950 мкл надосадочной жидкости, осадок ресуспендировать и распределить по чашке Петри с агаром и селективным антибиотиком и 2 % глюкозой. Инкубировать при +37 °С 16 ч.

На следующий день оценивается эффективность электропорации. Она определяется как количество колониеобразующих единиц, полученных путем электропорации 1 мкг плазмиды, на данный объем компетентных клеток. Чем выше компетентность полученных клеток, тем большее разнообразие фаговой библиотеки будет получено. Клетки считаются высококомпетентными начиная с 10^{10} КОЕ.

Фаг-помощник

Наряду с фагмидой важной составляющей успешного получения разнообразных библиотек является фаг-помощник. Он требуется для сборки фаговых частиц путем инфицирования клеток, содержащих фагмиду. Фаг-помощник несет все гены, необходимые для инфицирования, репли-

кации, сборки и почкования, и таким образом обеспечивает фагмиду, которая несет ген, кодирующий слитый белок рIII-scFv, белками, необходимыми для амплификации.

Фаг-помощник инфицирует бактерию, сначала прикрепляясь к ее F-пилям, а затем, после присоединения, транспортирует свой геном в цитоплазму клетки-хозяина. Внутри клетки геном фага инициирует выработку фагмидной одноцепочечной ДНК в цитоплазме. Затем фагмидная ДНК упаковывается в фаговые частицы. Фаговые частицы, содержащие одноцепочечную ДНК, высвобождаются из бактериальной клетки во внеклеточную среду. Нитевидные фаги тормозят рост бактерий, но, в отличие от фага λ и фага T7, не лизируют клетки «хозяина». Фаги-помощники, как правило, разработаны таким образом, что упаковка ДНК в них идет менее эффективно, чем упаковка фагмид, так, что полученные фаговые частицы содержат преимущественно фагмидную ДНК. Это происходит за счет дефектного сайта начала репликации (Lund et al., 2010).

В настоящее время в качестве основного фага-помощника в лабораториях используют M13KO7 (Russel et al., 1986; Vieira, Messing, 1987; Du, Zhang, 2009). Все другие фаги-помощники являются его производными. Фаг-помощник M13KO7 представляет собой производное фага M13, несет гетерологичную, низкокопийную точку начала репликации p15A. Когда в бактерии-хозяине присутствует только фаг M13KO7, репликации достаточно для достижения его высоких титров. Однако если присутствует большое количество копий фагмиды, она будет вытеснять геном фага-помощника во время упаковки, а это означает, что большинство собирающихся фаговых частиц будут нести ДНК фагмиды (Vieira, Messing, 1987). В состав капсида получаемых фаговых частиц будут входить рIII, кодируемый геномом фага-помощника, а также химерный белок рIII-scFv, кодируемый фагмидой. На практике происходит предпочтительное включение рIII

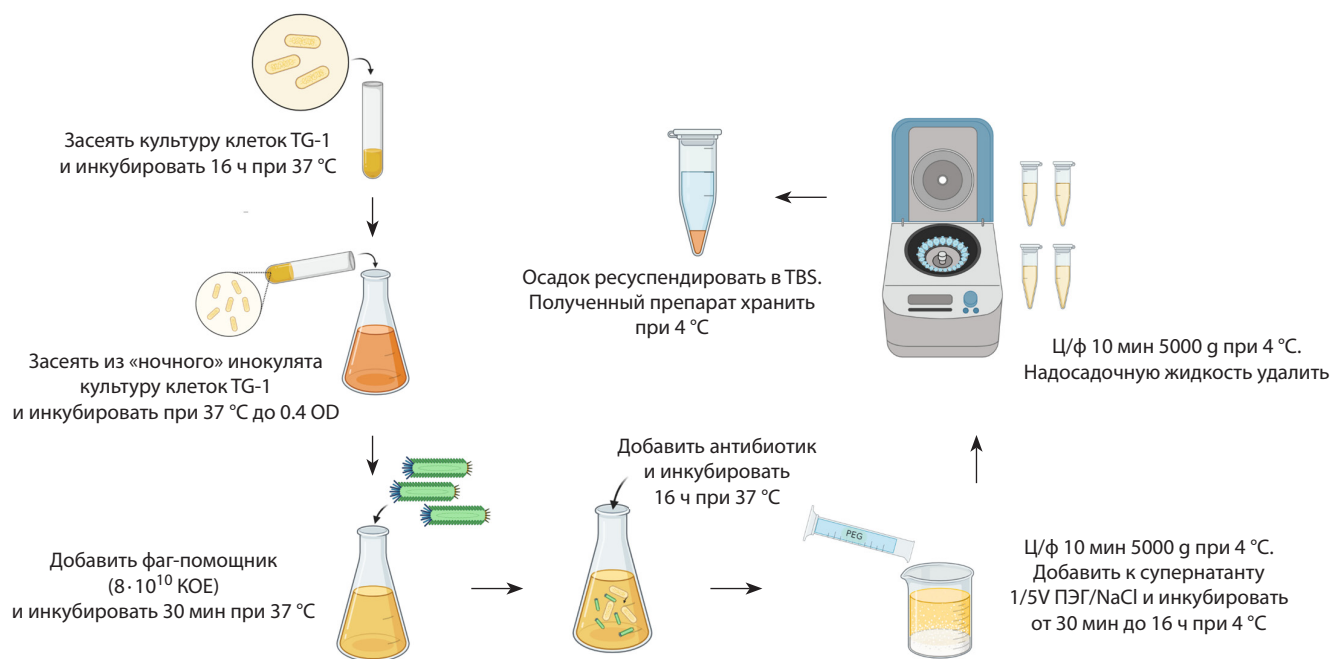


Рис. 6. Схема амплификации фага-помощника.

дикого типа из фага-помощника. Это означает, что большинство фаговых частиц будут «лысыми» (без химерного рПШ-scFv). Предпочтительный дисплей рПШ, а не слитого рПШ-scFv, вероятно, обусловлен комбинацией различий в уровнях экспрессии/трансляции и тем фактом, что часть слитого рПШ-scFv, по всей видимости, деградирует.

Выбор конкретного фага-помощника для работы достаточно сложен. Несмотря на заявленную разницу в свойствах, на практике некоторые производные фага-помощника M13KO7 ничем не отличаются друг от друга. Так, например, все производные фага-помощника CM13 дают более крупные бляшки и более высокие титры (в два раза больше КОЕ/мл), поэтому его легче подготовить. Фаг-помощник CM13 постоянно обеспечивает хорошие выходы, даже при низкой множественности заражения, но имеет более низкий коэффициент упаковки. В то же время фаг-помощник M13KO7 дает аналогичные выходы фагов, требует точного соблюдения плотности культуры бактерии (около 0.5 OD₆₀₀) для лучшего заражения клеток и обеспечивает высокий коэффициент упаковки. M13KO7 рекомендуется для получения одноцепочечной ДНК, например для мутагенеза по Кункелю, из-за лучшего коэффициента упаковки. Фаг-помощник R408 является производным f1, не несет устойчивости к антибиотикам и, возможно, улучшает упаковку одноцепочечной ДНК (Dotto et al., 1981).

Весьма привлекательной заменой «традиционным» фагам-помощникам является гиперфаг (Rondot et al., 2001). Гиперфаги содержат геном с делецией гена рПШ. Для их получения используют пакующие клетки *E. coli*, синтезирующие функциональный рПШ, необходимый для формирования полноценной частицы и упаковки фагового генома. Образующиеся гиперфаги несут на своей поверхности функциональный рПШ, но их геном дефектен по гену рПШ. Каждый из полученных фагов несет на своей

поверхности несколько копий антитела или пептида, что значительно повышает эффективность пэннинга.

Несмотря на то что получение фага-помощника коммерчески доступно, для удобства работы полезно проводить амплификацию фага-помощника, который по биологическому титру не будет уступать коммерческому. Одним из важных критериев наработки фага-помощника является оптическая плотность инфицируемой культуры клеток *E. coli*; оптимальным считается значение 0.4 OD (рис. 6). Более высокие плотности приводят к тому, что множество нетрансдуцированных бактерий не будет продуцировать вирионы, тогда как более низкие плотности могут усилить несоответствия, вызванные различиями в скорости роста фагов и более низкой продукцией фагов, а также экспрессией токсичных слитых белков, ограничивающих рост бактерий. Критической также является инфицирующая доза фага-помощника. Ее оптимальная величина $8 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл, избыток, как правило, приводит к перерасходу препарата.

При заражении клеток фагом-помощником необходимо проводить инкубацию без перемешивания. Перемешивание способствует росту клеток, следовательно, не все клетки будут заражены фагом-помощником. Важно также соблюдать временные интервалы: инкубирование культуры клеток с фагом-помощником при +37 °C проводят не более 30 мин. Обеспечение исключительного роста клеток, зараженных фагом-помощником, достигается добавлением антибиотика (в зависимости от того, какой антибиотик заложен в геноме фага-помощника), в большинстве случаев это канамицин.

При осаждении фага-помощника раствором ПЭГ/NaCl препарат инкубируют 16 ч при +4 °C. Это способствует лучшему осаждению фага-помощника. Осаждение желательнее провести дважды, так как после первого раза остается какое-то количество препарата в супернатанте.

Полученный препарат необходимо растворить в буфере TBS. Количество буфера TBS для каждого случая индивидуально и зависит от размера осадка. Препарат следует хранить при +4 °С.

Заключение

В настоящей статье мы попытались отразить основные проблемы, возникающие у исследователей, имеющих дело с созданием фаговых библиотек, и способы их решения. Одной из главных проблем в создании фаговых библиотек антител, на наш взгляд, является подготовка фагмидного вектора к встройке разнообразия генов антител, от чего в дальнейшем критически зависит разнообразие библиотеки. Не менее важны амплификация и получение очищенного препарата фага-помощника, а также получение высококомпетентных клеток для проведения электропорации.

Несмотря на существующие методические проблемы, технология фагового дисплея продолжает успешно развиваться. Эта технология привлекательна по ряду причин, таких как относительная простота в исполнении, возможности скрининга большого количества образцов за малый промежуток времени и отбора антител против широкого круга антигенов. Фаговый дисплей открыл новую сферу возможностей в обнаружении и разработке антител. Использование фаговых библиотек фрагментов антител человека позволяет отказаться от применения для терапии химерных или гуманизированных антител и, таким образом, избежать проблем, связанных с иммуногенностью препаратов.

Хотелось бы отметить, что данная статья не является идеальным пособием, однако может помочь в решении некоторых проблем в получении фаговой библиотеки антител, обладающей большим репертуаром.

Список литературы / References

- Ильичев А.А., Миненкова О.О., Татьков С.И., Карпышев Н.Н., Ерошкин А.М., Петренко В.А., Сандакчиев Л.С. Получение жизнеспособного варианта фага M13 со встроенным чужеродным пептидом в основной белок оболочки. *Докл. АН СССР*. 1989;307(2):481-483
[Ilyichev A.A., Minenkova O.O., Tatkov S.I., Karpishev N.N., Eroshkin A.M., Petrenko V.A., Sandakchiev L.S. Creation of a viable variant of phage M13 by inserting foreign peptide in major coat protein. *Doklady AN SSSR = Doklady Biological Sciences*. 1989;307(2):481-483 (in Russian)]
- Маниатис Т., Фрич Э., Эмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984
[Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982]
- Barbas C.F., Kang A.S., Lerner R.A., Benkovic S.J. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene-III site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991;88(18):7978-7982. DOI 10.1073/pnas.88.18.7978
- Bass S., Greene R., Wells J.A. Hormone phage: an enrichment method for variant proteins with altered binding-properties. *Proteins*. 1990; 8(4):309-314. DOI 10.1002/prot.340080405
- Brigati J.R., Petrenko V.A. Thermostability of landscape phage probes. *Anal. Bioanal. Chem.* 2005;382(6):1346-1350. DOI 10.1007/s00216-005-3289-y
- Chai D., Wang G., Fang L., Li H., Liu S., Zhu H., Zheng J. The optimization system for preparation of TG1 competent cells and electrotransformation. *MicrobiologyOpen*. 2020;9(7):e1043. DOI 10.1002/mbo3.1043
- Chasteen L., Ayriss J., Pavlik P., Bradbury A.R. Eliminating helper phage from phage display. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(21):e145. DOI 10.1093/nar/gkl772
- Chung W.J., Oh J.W., Kwak K., Lee B.Y., Meyer J., Wang E., Hexter A., Lee S.W. Biomimetic self-templating supramolecular structures. *Nature*. 2011;478(7369):364-368. DOI 10.1038/nature10513
- Dotto G.F., Enea V., Zinder N.D. Functional analysis of bacteriophage fl intergenic region. *Virology*. 1981;114(2):463-473. DOI 10.1016/0042-6822(81)90226-9
- Du D., Zhang R. Application and progress of helper phage in phage display. *Microbiology*. 2009;36(2):261-266
- Gao C., Mao S., Lo C.H., Wirsching P., Lerner R.A., Janda K.D. Making artificial antibodies: a format for phage display of combinatorial heterodimeric arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999;96(11):6025-6030. DOI 10.1073/pnas.96.11.6025
- Gao C.S., Mao S.L., Kaufmann G., Wirsching P., Lerner R.A., Janda K.D. A method for the generation of combinatorial antibody libraries using pIX phage display. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002; 99(20):12612-12616. DOI 10.1073/pnas.192467999
- Hoogenboom H.R., Griffiths A.D., Johnson K.S., Chiswell D.J., Hudson P., Winter G. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(15):4133-4137. DOI 10.1093/nar/19.15.4133
- Ishina I.A., Filimonova I.N., Zakharova M.Y., Ovchinnikova L.A., Mamedov A.E., Lomakin Y.A., Belogurov A.A., Jr. Exhaustive search of the receptor ligands by the CyCLOPS (Cytometry Cell-Labeling Operable Phage Screening) technique. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(17):6258. DOI 10.3390/ijms21176258
- Kay B., Winter J., McCafferty J. (Eds.). *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*. N.Y.: Acad. Press, 1996. DOI 10.1016/B978-0-12-402380-2.X5000-X
- Krebber A., Bornhauser S., Burmester J., Honegger A., Willuda J., Bosshard H.R., Pluckthun A. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J. Immunol. Methods*. 1997;201(1):35-55. DOI 10.1016/S0022-1759(96)00208-6
- Larocca D., Burg M.A., Jensen-Pergakes K., Ravey E.P., Gonzalez A.M., Baird A. Evolving phage vectors for cell targeted gene delivery. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2002;3(1):45-57. DOI 10.2174/1389201023378490
- Ledsgaard L., Kilstrup M., Karatt-Vellatt A., McCafferty J., Laustsen A.H. Basics of antibody phage display technology. *Toxins*. 2018; 10(6):236. DOI 10.3390/toxins10060236
- Lund P.E., Hunt R.C., Gottesman M.M., Kimchi-Sarfaty C. Pseudovirions as vehicles for the delivery of siRNA. *Pharm Res*. 2010; 27(3):400-420. DOI 10.1007/s11095-009-0012-2
- McCafferty J., Griffiths A.D., Winter G., Chiswell D.J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*. 1990;348(6301):552-554. DOI 10.1038/348552a0
- Näkelä O., Kaartinen M., Pelkonen J.L., Karjalainen K. Inheritance of antibody specificity V. Anti-2-phenylloxazalone in the mouse. *J. Exp. Med.* 1978;148(6):1644-1660. DOI 10.1084/jem.148.6.1644
- O'Callaghan R., Bradley R., Paranchych W. The effect of M13 phage infection upon the F pili of *E. coli*. *Virology*. 1973;54(1):220-229. DOI 10.1016/0042-6822(73)90131-1
- Pardon E., Laeremans T., Triest S., Rasmussen S.G.F., Wohlkönig A., Ruf A., Muyldermans S., Hol W.G.J., Kobilka B.K., Steyaert J. A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nat. Protoc.* 2014;9(3):674-693. DOI 10.1038/nprot.2014.039
- Parmley S.F., Smith G.P. Antibody-selectable filamentous FD phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene*. 1988;73(2):305-318. DOI 10.1016/0378-1119(88)90495-7
- Qi H., Lu H., Qiu H.J., Petrenko V., Liu A. Phagemid vectors for phage display: properties, characteristics and construction. *J. Mol. Biol.* 2012;417(3):129-143. DOI 10.1016/j.jmb.2012.01.038

- Rasched I., Oberer E. Ff coliphages: structural and functional relationships. *Microbiol. Rev.* 1986;50(4):401-427. DOI 10.1128/mr.50.4.401-427.1986
- Rondot S., Koch J., Breitling F., Dübel S. A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nat. Biotechnol.* 2001;19(1):75-78. DOI 10.1038/83567
- Russel M., Kidd S., Kelley M.R. An improved filamentous helper phage for generating single-stranded plasmid DNA. *Gene.* 1986; 45(3):333-338. DOI 10.1016/0378-1119(86)90032-6
- Smith G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* 1985; 228(4705):1315-1317. DOI 10.1126/science.4001944
- Smith G.P. Preface (Surface display and peptide libraries. Cold Spring Harbor Laboratory, April 4–7, 1992. Proceedings). *Gene.* 1993; 128(1):1-2. DOI 10.1016/0378-1119(93)90145-s
- Sokullu E., Soleymani Abyaneh H., Gauthier A.M. Plant/bacterial virus-based drug discovery, drug delivery, and therapeutics. *Pharmaceutics.* 2019;11(5):211. DOI 10.3390/pharmaceutics11050211
- Tu Z., He G., Li K.X., Chen M.J., Chang J., Chen L., Yao Q., Dongping P., Ye H., Shi J., Wu X. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. *Electron. J. Biotechnol.* 2005; 8(1):113-120. DOI 10.2225/vol8-issue1-fulltext-8
- Veronese F.D.M., Willis A.E., Boyerthompson C., Appella E., Perham R.N. Structural mimicry and enhanced immunogenicity of peptide epitopes displayed on filamentous bacteriophage. The V3 loop of HIV-1 gp120. *J. Mol. Biol.* 1994;243(2):167-172. DOI 10.1006/jmbi.1994.1643
- Vieira J., Messing J. Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 1987;153:3-11. DOI 10.1016/0076-6879(87)53044-0

Финансирование. Работа выполнена в рамках темы ГЗ-23/21 плана основных мероприятий ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора на 2024 г.

Благодарности. Авторы выражают искреннюю благодарность заведующему отделом молекулярной иммунологии, доктору биологических наук Таранину Александру Владимировичу, старшим научным сотрудникам, кандидатам биологических наук Чикаеву Николаю Андреевичу и Наякшину Александру Матвеевичу за консультации при работе с фаговыми библиотеками.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 27.07.2023. После доработки 18.01.2024. Принята к публикации 19.01.2024.