

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-306

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОДНОЦЕПОЧЕЧНОГО
ВАРИАБЕЛЬНОГО ФРАГМЕНТА АНТИТЕЛА ПРОТИВ hTMEPAI,
ПОЛУЧЕННОГО ИЗ КРЫСИНОЙ ГИБРИДОМЫ**

**FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF A SINGLE-CHAIN
VARIABLE FRAGMENT AGAINST hTMEPAI
OBTAINED FROM RAT HYBRIDOMA**

К. О. Баскакова¹, П. К. Кузьмичев², И. П. Охрименко², М. С. Карбышев^{1,3}

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва

²Московский физико-технический институт, Долгопрудный

³Московский политехнический университет, Москва

K. O. Baskakova¹, P. K. Kuzmichev², I. P. Okhrimenko², M. S. Karbyshev^{1,3}

¹N. I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

²Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny

³Moscow Polytechnic University

✉ christina.baskakova@gmail.com

Аннотация

Получены препараты анти-hTMEPAI одноцепочечных антител (scFv) из клеток гибридом крысы с использованием гетерологичной системы экспрессии в *E. coli*. Созданные scFv продемонстрировали высокую аффинность к рекомбинантному hTMEPAI, ресольюбизированному в детергенте, а также к нативной версии целевого антигена. Полученные результаты подтверждают перспективность применения scFv для дальнейших структурно-функциональных исследований hTMEPAI в мембраноподобных условиях.

Abstract

Anti-hTMEPAI single-chain antibodies (scFv) were obtained from rat hybridoma cells using a heterologous expression system in *E. coli*. The scFv demonstrated high affinity for recombinant hTMEPAI solubilized in detergent, as well as for the native version of the target antigen. The results confirm the promise of using scFv for further structural and functional studies of hTMEPAI in membrane-like conditions.

Белок hTMEPAI (transmembrane prostate androgen-induced protein 1) является перспективным биомаркером и возможной мишенью для разработки новых средств таргетной иммунотерапии солидных злокачественных новообразований, так как вовлечен в процессы злокачественной трансформации и прогрессии [1]. Разработка антител к интегральным мембранным белкам затруднена ввиду структурных особенностей и сложностей получения [2]. Одноцепочечные переменные фрагменты антител (scFv) представляют собой удобный формат для применения в диагностических целях благодаря небольшому размеру и простоте наработки в гетерологичных системах экспрессии.

Для получения препаратов рекомбинантных анти-TMEPAI scFv переменные домены тяжелых и легких цепей, полученные из клеток гибридомы крысы [3], амплифицировали методом ПЦР и субклонировали в вектор pET-28a (+) для дальнейшей периплазматической экспрессии в клетках *E. coli* Shuffle T7 [4]. Полученный в бесклеточной белоксинтезирующей системе целевой антиген (hTMEPAI изоформа 1) ресольюбизировали в различных детергентах для скрининга оптимальных условий. Функциональную характеристику полученных scFv антител осуществляли при помощи поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и тестов на клетках-оверэкспрессорах HEK293.

Средний выход рекомбинантных анти-TMEPAI scFv-фрагмента при наработке в *E. coli* Shuffle T7 составил $10,2 \pm 0,5$ мг/л бактериальной культуры. Анализ гомогенности препаратов методом гель-фильтрации, подтвердил, что больше 95 % очищенного белка находится в мономерной форме, что подтверждается отсутствием значительных пиков, характерных для агрегации.

Аналитическая ресольюбизация антигена в различных детергентах (SDS, Triton X-100, Fos-12, MNG-OG, Brij535, b-OG, LPPG) позволила определить, что в присутствии MNG-OG и Fos-12 целевой белок — hTMEPAI — переходил в растворимую фракцию более чем на 80 %.

Функциональная активность препаратов scFv-антител была оценена с помощью SPR, подтвердившей специфическое связывание с hTMEPAI при $KD\ 1,2 \pm 0,3\ nM$ в присутствии MNG-OG. Также с помощью проточной цитометрии в клеточных тестах с использованием линии HEK293 наблюдалось эффективное связывание scFv.

Таким образом, полученные препараты scFv обладают высокой специфичностью и антигенсвязывающей активностью в отношении hTMEPAI, что делает их перспективными инструментами для дальнейших структурно-функциональных исследований.

Литература

1. Karbyshev M. S. et al. Development of novel monoclonal antibodies for evaluation of transmembrane prostate androgen-induced protein 1 (TMEPAI) expression patterns in gastric cancer // Pathology & Oncology Research. 2018. Vol. 24. P. 427–438.
2. Zhang C. Y. et al. Database study on the expression and purification of membrane proteins // Protein & Peptide Letters. 2021. Vol. 28, No. 9. P. 972–982.
3. Rottach A. et al. Generation and characterization of a rat monoclonal antibody specific for PCNA // Hybridoma (Larchmont). 2008. Vol. 27, No. 2.
4. Breitling F., Dübel S. Cloning and expression of single-chain fragments (scFv) from mouse and rat hybridomas // Methods in Molecular Medicine. 1998. Vol. 13.