

Імобілізовані одностанцюгові антитіла для афінного очищення рекомбінантного інтерферону $\alpha 2b$ людини

П. В. Гільчук, О. В. Окунєв, Д. М. Іродов, М. В. Павлова¹, О. Я. Яковенко¹

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Вул. Володимирська, 64, Київ, 01033, Україна

gilchuk@ukr.net

*Представлено лабораторний метод отримання афінного імуносорбенту для хроматографічного очищення білків, який полягає в орієнтованій і нековалентній іммобілізації рекомбінантних фрагментів антитіл на целюлозному носії. На основі ДНК-послідовностей одностанцюгових антитіл (ScFv) до інтерферону IFN- $\alpha 2b$ людини і целюлозов'язувального домену (CBD) із целюлозолітичного комплексу *Clostridium thermocellum* сконструйовано злитий білок (ScFv-CBD). Після експресії гена ScFv-CBD в *Escherichia coli* і виділення цільового білка у функціонально активній формі здійснено його пряму іммобілізацію на мікрогранулярній целюлозі. Целюлозу з іммобілізованим ScFv-CBD використано як афінний сорбент для очищення рекомбінантного IFN- $\alpha 2b$ людини.*

Ключові слова: одностанцюгові антитіла, імуноафінна хроматографія, іммобілізація білка, злитий білок.

Конструювання рекомбінантних фрагментів антитіла (recombinant antibody fragments, Rabs) та їхня експресія в гетерологічних системах є сучасною біотехнологією отримання високоселективних імунологічних реагентів для фундаментальних досліджень, діагностики і терапії [1, 2]. Одностанцюгові антитіла (single chain Fv fragment, ScFv) є рекомбінантними молекулами, сконструйованими завдяки генетичному об'єднанню ДНК варіабельних доменів легкого і важкого ланцюгів антитіла через штучний лінкер, що експресуються продуцентами як одна поліпептидна послідовність [3]. На сьогодні ScFv надзвичайно широко використовують у багатьох прикладних і фундаментальних роботах, що зумовлено можливістю селекції молекул з не-

обхідними характеристиками активного центра, а також забезпечення їхнього великомасштабного продукування з використанням недорогих і високо-ефективних систем експресії [4].

Один із перспективних напрямків застосування Rabs полягає в розробці на їхній основі дешевих матриць для імуноафінної хроматографії (ІАХ). У багатьох експериментальних роботах виявлено принципову придатність Rabs як біолігандів для афінного очищення цільових білків [5, 6]. Також запропоновано різні стратегії іммобілізації фрагментів антитіла на хроматографічних носіях, включаючи використання хімічно активованих матриць або зв'язування через певні білкові компоненти, які можуть бути введені до складу цільових послідовностей генно-інженерним шляхом [7, 8]. Основним недоліком методів хімічної іммобілізації є

випадкова орієнтація активного центра молекули Rabs відносно поверхні матриці, що призводить до його екранування і низької доступності для взаємодії з антигеном.

У цій роботі розроблено лабораторний метод отримання афінного імуносорбенту для хроматографічного очищення рекомбінантного IFN- α 2b людини, який полягає в орієнтованій і нековалентній іммобілізації молекул ScFv на целюлозному носії через целюлозозв'язувальний домен (cellulose binding domain, CBD) *Clostridium thermocellum*.

ДНК специфічних одноланцюгових антитіл до IFN- α 2b людини виділено з імунної бібліотеки кДНК миші технікою фагового дисплею за допомогою набору реактивів Recombinant Phage Antibody System («Amersham Biosciences», Швеція) [9]. Для конструювання злитого білка цільову послідовність ScFv ампліфікували з фагміди *pCANTAB 5E* і субклонували в експресійному векторі *pET-24a(+)* («Novagen», США) разом з геном целюлозозв'язу-

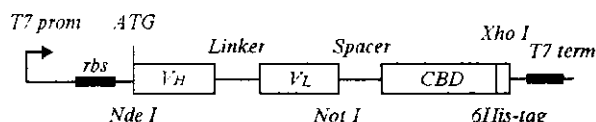


Рис. 1. Схема розташування елементів експресійної касети у плазмідному векторі *pET-24 a(+)*

вального домену (GenBank Acession N X68233) (рис. 1). Злитий білок експресували в клітинах *E. coli* штаму BL21 (DE3), трансформованих відповідною плазмідною, де він накопичувався у вигляді тілець включення. Після виділення останніх ScFv-CBD солюбілізували в розчині, який містив 6 М гуанідин-гідрохлорид, та попередньо очищували в денатурувальних умовах методом IMAC [10] на колонці Ni²⁺ HisTrap™ («Amersham Biosciences»). Очищений ScFv-CBD ренатурували градієнтним видаленням гуанідин-гідрохлориду з використанням лабораторної системи для ультрафільтрації «Quix Stand» («Amersham Biosciences») і методу, описаного в роботі [11].

Після ренатурації ScFv-CBD іммобілізували на мікрогранульованій целюлозі CC31 («Whatman», Велика Британія) [12]. Афінний сорбент (~ 40 мл) промивали декілька разів буфером для екваїбрації (фосфатно-сольовий буфер (PBS), pH 8,0) і пакували у хроматографічну колонку ХК 16 («Amersham Biosciences»). Хроматографію проводили, використовуючи систему «Acta Prime» («Amersham Biosciences»). На колонку наносили освітлені лізати клітин *E. coli*, які містили рекомбінантний IFN- α 2b людини (ВНДК «Фарм Біотек», Україна). Сорбент промивали буфером PBS, зв'язаний IFN- α 2b елюювали при ступінчастому зниженні величини pH до 3,0 буфером, що містить 0,1 М гліцин-HCl, 0,5 М NaCl. Концентрацію IFN- α 2b визначали вимірю-

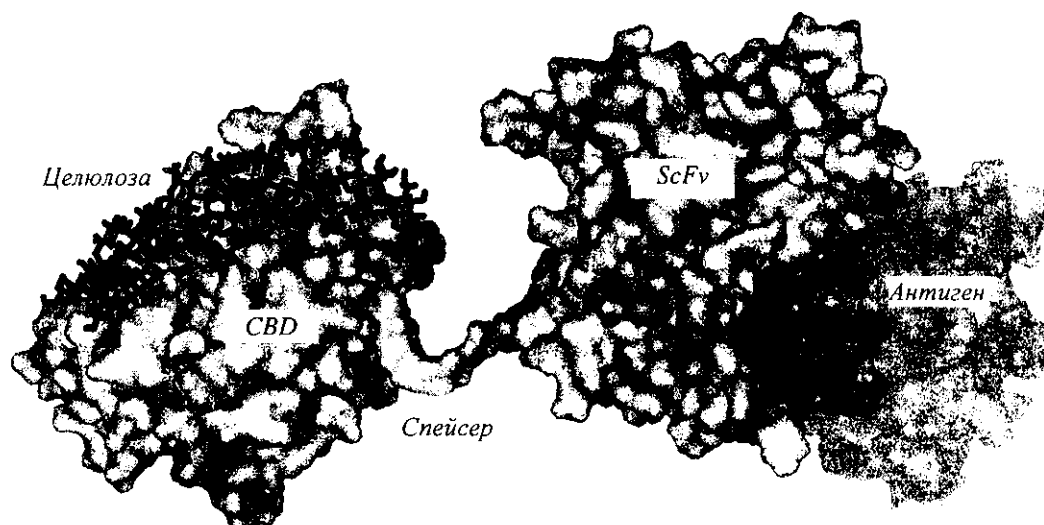


Рис. 2. Схематичне зображення злитого білка ScFv-CBD, який містить афінні центри для зв'язування антигену і іммобілізації на целюлозі

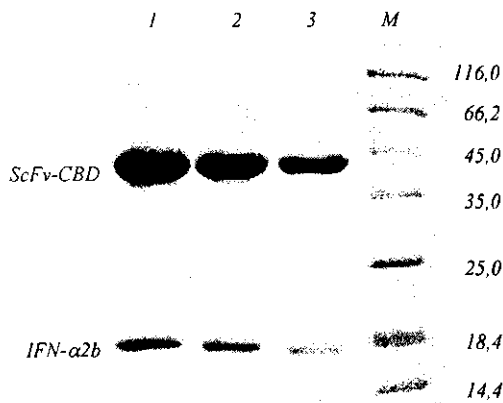


Рис. 3. Електрофоретичний аналіз білків у 15 %-му ДС-На ПААГ. Показано комплекси білків, які утворюються на целюлозі з іммобілізованим ScFv-CBD (~45 кДа) після нанесення IFN-α2b (~18 кДа). Імунні комплекси з целюлози елюювали буфером, який містив 8 М сечовину, 0,5% ДС-На і 0,1 М 2-меркаптоетанол. На доріжки 1—3 нанесено кількість матеріалу, яка відповідає 10; 5 і 2,5 мкл імуноафінного сорбенту; M — білки — маркери молекулярної маси; гель фарбували кумасі синім R-250

ванням абсорбції (A_{280}) чистоту препарату аналізували електрофоретичним розділенням в 15 %-му ДС-На ПААГ.

Сконструйований гібридний білок (~46 кДа) містить два афінних центри, представлені N-кінцевою послідовністю ScFv та C-кінцевою послідовністю CBD, які з'єднані за допомогою спейсера з 13 амінокислотних залишків (-Gly₃-Ser-Glu-Gly₃-Ser-Glu-Gly₃-). Послідовність афінної мітки «(His)₆-tag», введеної до складу вектора експресії, дозволяє попередньо очищувати солюбілізований з тілець включення ScFv-CBD методом ІМАС. Проведений дизайн рекомбінантної молекули забезпечує формування стабільного комплексу між целюлозов'язувальним доменом і вуглеводним остовом целюлозного сорбенту та експонування активного центра іммобілізованого ScFv в оптимальне положення для взаємодії з антигеном (рис. 2).

Функціонально активний білок ScFv-CBD одержували з тілець включення *E. coli* з використанням обладнання для ультрафільтрації і методу ренатурації, запропонованого в роботі [11].

Ефективність ренатурації розраховували за відсотком біологічно активних афінних центрів злитого білка ScFv-CBD — окремо для кожного компонента (ScFv і CBD) з використанням раніше розробленого нами методу (неопубліковані дані). Принцип його полягає у наступному: для ScFv

показником біологічної активності є здатність зв'язувати антиген, для CBD — селективна взаємодія з целюлозою. Біологічну активність CBD визначали за відсотком білка ScFv-CBD, який зв'язався з целюлозою після ренатурації. Біологічну активність компонента ScFv розраховували за співвідношенням кількості білків в імунних комплексах, які утворювалися на афінному сорбенті (целюлоза з іммобілізованим ScFv-CBD) при селективному зв'язуванні молекул IFN-α2b. Для цього комплекси білків ScFv-CBD/IFN-α2b елюювали з целюлози в денатурувальних умовах і розділяли електрофорезом у ПААГ гелі (рис. 3). Молярне співвідношення білків у комплексах оцінювали денситометруванням відповідних доріжок гелю з наступним їхнім аналізом програмою TotalLab («Amersham Biosciences»). Із застосуванням описаних вище методів встановлено, що ефективність ренатурації для компонентів ScFv і CBD злитого білка ScFv-CBD складає відповідно 98 і 45 %.

Використання ефективного методу ренатурації дозволило виділити певну кількість розчинного матеріалу, яка виявилася достатньою для отримання препаративної кількості афінного сорбенту (40 мл сорбенту з густиною іммобілізації ліганду ~ 2 мг ScFv-CBD на 1 мл целюлози) і проведення аналітичного очищення IFN-α2b (молекулярна маса ~18 кДа).

На афінну колонку наносили освітлений лізат клітин *E. coli*, який містив експресований рекомбінантний IFN-α2b людини. Елюцію зв'язаного IFN-α2b здійснювали за м'яких умов (рН 3,0), що забезпечували його селективну дисоціацію без суттєвого «стікання» іммобілізованого ScFv-CBD (рис. 4, а). За даними електрофоретичного аналізу, у фракціях елюції рівень очищення IFN-α2b становить не менше 95 % і спостерігається лише одна мінорна смуга (~45 кДа), яка представляє собою продукт дисоціації ScFv-CBD з целюлози при рН 3,0 (рис. 4, б). Однак кількість ліганду, який «стікає», була не більше 0,1 % за один цикл роботи колонки від загального іммобілізованого білка, що практично не впливало на ефективність її роботи. За результатами вимірювання концентрації очищеного IFN-α2b розраховували динамічну ємність колонки, яка становила близько 0,1 мг IFN-α2b на 1 мл афінного сорбенту. Важливим результатом є те, що нами також виявлено можливість повторно-го використання отриманого сорбенту в послідов-

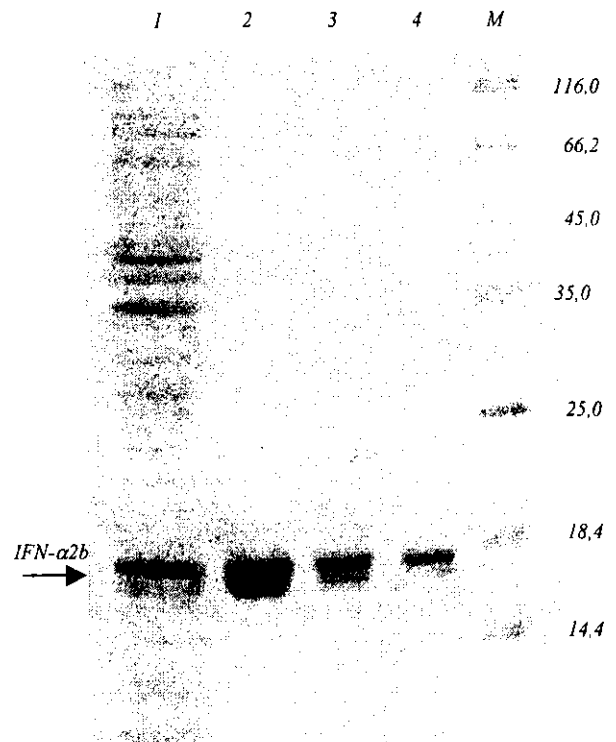
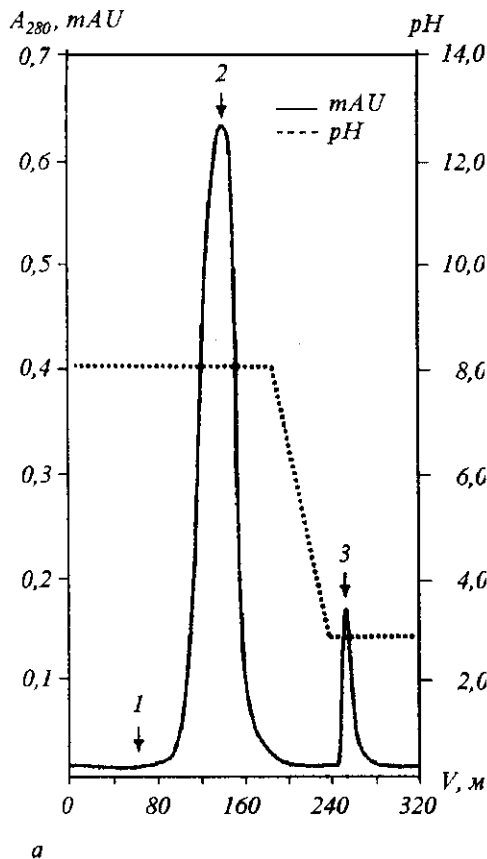


Рис. 4. Очищення рекомбінантного IFN- α 2b людини на імуноафінному сорбенті: а — профіль елювання (1 — нанесення освітленого лізату клітин *E. coli* з IFN- α 2b; 2 — білки, які не зв'язалися з сорбентом і видаляються при промиванні колонки буфером PBS; 3 — елювання зв'язаного IFN- α 2b при рН 3,0); б — електрофоретичний аналіз білків у 15 %-му ДС-На ПААГ (1 — екстракт білків *E. coli*, який наносили на колонку; 2—4 — фракції білків, які отримали елюванням при рН 3,0; М — білки — маркери молекулярної маси; гель фарбували синім R-250

них циклах хроматографічного очищення рекомбінантного IFN- α 2b людини.

У представленій роботі нами розроблено лабораторний метод приготування афінного сорбенту на основі одноланцюгових антитіл, які продукуються в *E. coli*, показано принципову можливість використання афінної колонки для одностадійного хроматографічного виділення рекомбінантного IFN- α 2b людини з освітлених лізатів клітин *E. coli* (чистота ~ 95 %), а також продемонстровано стабільність іммобілізованих ScFv у декількох послідовних циклах очищення.

Автори висловлюють щире подяку співробітникам Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України С. І. Андріанову, О. Ю. Сломінському і проф. Г. Л. Волкову за методичні вказівки та можливість користування ультрафільтраційним і хроматографічним обладнанням, а також співробітникам ВНДК «Фарм Біотек» — за надання екст-

рактів білків — продуцентів *E. coli* для проведення очищення рекомбінантного IFN- α 2b людини.

P. V. Gilchuk, O. V. Okunev, D. M. Irodov, M. V. Pavlova, O. Ya. Yakovenko

Immobilized single chain antibodies for affinity purification of recombinant human IFN- α 2b

Summary

A laboratory method for obtaining immunoaffine media for chromatographic purification of proteins based on orienting and non-covalent immobilization of recombinant antibody fragments on cellulose matrix is described. The single-chain antibody (ScFv) against human IFN- α 2b was genetically fused to cellulose-binding domain (CBD) from cellulosome complex of *Clostridium thermocellum* and expressed in *Escherichia coli*. After the isolation of the target protein in functionally active form from bacteria cells the directed immobilization on microgranular cellulose has been carried out. The cellulose with immobilized ScFv-CBD-fusion has been used as affinity medium to perform the purifications of recombinant human IFN- α 2b.

Key words: single chain antibodies, immunoaffinity chromatography, protein immobilization, fusion protein.

П. В. Гильчук, О. В. Окунев, Д. М. Иродов, М. В. Павлова,
О. Я. Яковенко

Иммобилизованные одноцепочечные антитела для аффинной
очистки рекомбинантного IFN- α 2b человека

Резюме

Представлен лабораторный метод получения иммуноаффинного сорбента для хроматографической очистки белков, основанный на ориентированной и нековалентной иммобилизации рекомбинантных фрагментов антител на целлюлозном носителе. На основе ДНК-последовательностей однонитчатых антител (ScFv) к IFN- α 2b человека и связывающего целлюлозу домена (CBD) из целлюлозолитического комплекса *Clostridium thermocellum* сконструирован слитый белок (ScFv-CBD). После экспрессии ScFv-CBD в клетках *Escherichia coli* и выделения целевого белка в функционально активной форме проведена его прямая иммобилизация на микрогранулированной целлюлозе. Целлюлоза с иммобилизованным ScFv-CBD использована как аффинный сорбент для очистки рекомбинантного IFN- α 2b человека.

Ключевые слова: одноцепочечные антитела, иммуноаффинная хроматография, иммобилизация белка, слитый белок.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Moroney S., Pluckhun A. Modern antibody technology: The impact on drug development // Modern Biopharmaceuticals.— Weinheim: Wiley VCH, 2005.—Vol. 4.—P. 1147—1186.
2. Holliger P., Hudson P. J. Engineering antibody fragments and the rise of single domains // Nature Biotechnol.—2005.—23.—P. 1126—1136.
3. Huston J. S., Levinson D., Mudgett-Hunter M., Tai M., Novotny J., Margolies M. N., Ridge R. J., Brucoleri R. E. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single chain Fv analog produced in *Escherichia coli* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1988.—85.—P. 5879—5883.
4. Pluckhun A., Krebber A., Krebber C., Horn U., Knupfer U., Wenderoth R., Nieba L., Proba K., Riesenberger D. Producing

antibodies in *Escherichia coli*: from PCR to fermentation // Antibody engineering / Eds J. McCafferty, H. R. Hoogenboom.—Oxford: IRL press, 1996.—P. 203—252.

5. Berry M. J., Davies J., Smith C. G., Smith I. Immobilization of Fv antibody fragments on porous silica and their utility in affinity chromatography // J. Chromatogr.—1991.—587.—P. 161—169.
6. Schild A., Kleist D., Welschhof M., Opelz G., Ramensee H. G., Schild H., Terness P. One-step single chain Fv recombinant antibody-based purification of gp96 for vaccine development // Cancer Res.—2000.—60.—P. 4175—4178.
7. Berdichevsky Y., Lamed R., Frenkel D., Gophana U., Bayer E. A., Yaron S., Shoham Y., Benhar I. Matrix-assisted refolding of single-chain Fv-cellulose binding domain fusion protein // Protein Exp. Purif.—1999.—17.—P. 249—259.
8. Blank K., Lidner P., Diafenbach B., Pluckhun A. Self-immobilized recombinant antibodies for immunoaffinity chromatography: genetic, parallel, and scalable protein purification // Protein Exp. Purif.—2002.—24.—P. 313—322.
9. Окунев О. В., Гильчук П. В., Иродов Д. М. Получение и характеристика одноцепочечных антител к интерферону α 2b человека // Укр. біохім. журн.—2005.—77, № 5.—P. 106—115.
10. Recombinant protein handbook: Protein amplification and simple purification // Amersham Pharmacia Biotech. (18-1142-75).—P. 108.
11. Sinicola J. R., Robinson A. S. Rapid refolding and polishing of single-chain antibodies from *Escherichia coli* inclusion bodies // Protein Exp. Purif.—2002.—26.—P. 301—308.
12. Morag E., Lapidot A., Govorko D., Lamed R., Wilchek M., Bayer E. A., Shoham Y. Expression, purification, and characterization of the cellulose-binding domain of the scaffoldin subunit from the cellulosome of *Clostridium thermocellum* // Appl. Environ. Microbiol.—1995.—61.—P. 1980—1986.

УДК 579.69 + 577.112 + 543.544.17
Надійшла до редакції 20.12.05