

## АГЛЯДЫ REVIEWS

УДК 577.322.23

Поступила в редакцию 10.01.2017

Received 10.01.2017

**Д. О. Дормешкин<sup>1</sup>, Е. А. Бричко<sup>2</sup>, А. А. Гилеп<sup>1</sup>, С. А. Усанов<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

<sup>2</sup>*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

### ФАГОВЫЙ ДИСПЛЕЙ В КОНСТРУИРОВАНИИ АНТИТЕЛ С ЗАДАНЫМИ СВОЙСТВАМИ

Уникальная особенность моноклональных антител высокоспецифично взаимодействовать с молекулярными мишенями позволила им занять ведущее положение в терапии онкологических и аутоиммунных заболеваний, стать незаменимым инструментом протеомных исследований и компонентом диагностических систем. Представлен обзор новейших литературных данных по использованию метода фагового дисплея для получения рекомбинантных антител, которые другими методами получить невозможно, а также собственные оригинальные результаты в этой области. На основании бионформационного анализа структур депонированных комплексов антител с антигенами нами создана комбинаторная библиотека *Fab* фрагментов антител человека, обладающая разнообразием более  $10^{10}$  независимых клонов и способная служить источником рекомбинантных антител. С использованием негативной селекции нами получены и характеризованы высокоспецифичные однодоменные антитела к альдостерон-синтазе (цитохром P45011B2, CYP11B2), не обладающие в ИФА кросс-реактивностью с ее гомологом CYP11B1 (93% идентичности последовательностей), а также антитела к таким высокомолекулярным мишеням, как эритропоэтин, соматотропный гормон и тиреопероксидаза человека.

*Ключевые слова:* рекомбинантные антитела, фаговый дисплей, молекулярное клонирование, цитохромы P450.

**D. O. Dormeshkin<sup>1</sup>, E. A. Brichko<sup>2</sup>, A. A. Gilep<sup>1</sup>, S. A. Usanov<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

<sup>2</sup>*Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus*

### PHAGE DISPLAY IN ENGINEERING OF ANTIBODIES WITH DESIRED PROPERTIES

Antibodies are an essential tool being a part of immunodiagnosics, therapeutics and life science research instruments. In this paper we analyze the recent developments in recombinant antibodies generation by means of phage display technology. We also provide our own results dedicated to antibodies development process. Analysis of antibody-antigen complexes with resolved structures allow to create synthetic phage display library of *Fab* antibody fragments with the diversity of  $10^{10}$  independent clones. Utilizing a negative selection approach, we succeeded in generation and characterization of specific single-domain antibodies that has substantially different binding kinetics to CYP11B2 and CYP11B1 isoenzymes – proteins with 93% sequence identity. We also generated specific binders to a few high-molecular weight human antigens – erythropoetin, growth hormone and thyroperoxidase.

*Keywords:* recombinant antibodies, phage display, molecular cloning, cytochromes P450.

**Введение.** Начиная с середины 1990-х годов фармацевтический рынок претерпевает глобальные изменения, связанные со смещением интереса производителей от синтеза низкомолекулярных субстанций к биотехнологическому производству биофармацевтических препаратов. По прогнозам аналитиков уже к 2050 г. более 75% фармацевтического рынка будет представлено биофармпрепаратами. В частности, особый интерес представляют препараты на основе моноклональных антител.

Ключевая особенность антител специфично взаимодействовать с разнообразными молекулярными мишенями позволила им занять ведущее положение в терапии различных заболеваний, в особенности онкологических и аутоиммунных, а также стать незаменимым инструментом протеомных исследований и компонентом диагностических систем [1–3]. Большинство диагно-

стических систем, применяемых в клинической диагностике, основаны на принципе аффинного узнавания антигена соответствующими антителами. На сегодняшний день уже более 65 препаратов терапевтических антител одобрено FDA к применению, еще сотни проходят клинические испытания (таблица) [3]. Ожидается, что в 2017 г. общий объем продаж этих препаратов составит более 90 млрд дол. США [4]. В рамках проекта *Human Proteome Atlas* получены и валидированы антитела практически ко всем белкам протеома человека [5, 6]

Такие успехи были бы невозможны без развития молекулярно-генетических методов, позволяющих получать рекомбинантные антитела и их фрагменты с заданными свойствами. Наиболее эффективной из таких технологий является фаговый дисплей, который позволяет получать в кратчайшие сроки (от двух недель) антитела с заданными свойствами практически к любым низко- и высокомолекулярным мишеням, включая токсичные и неиммуногенные антигены.

#### Основные, одобренные к применению FDA, препараты терапевтических антител

##### Some FDA approved therapeutic antibodies

Область использования	Год	Производитель	Действующее вещество (торговое название)	Мишень	Формат антитела
Трансплантология	1986	Ortho Biotech (J&J)	Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3 <sup>®</sup> )	CD3	IgG2a мыши
	1997	PDL/Roche	Daclizumab (Zenapax <sup>®</sup> )	CD25	IgG1 гуманизированное
	1998	Novartis	Basiliximab (Simulect <sup>®</sup> )	CD25	IgG1 гуманизированное
Онкология	1997	Biogen/Genentech	Rituximab (Rituxan <sup>®</sup> )	CD20	IgG1 гуманизированное
	1998	Genentech	Trastuzumab (Herceptin <sup>®</sup> )	HER2	IgG1 гуманизированное
	2003	Corixa	<sup>131</sup> I-tositumomab (Bexxar <sup>®</sup> )	CD20	Конъюгат IgG1 мыши с изотопом йода-131
	2014	Merck	Pembrolizumab (Keytruda <sup>®</sup> )	PD-1	IgG1 гуманизированное
	2016	Genentech/Roche	Atezolizumab (Tecentriq <sup>®</sup> )	PD-L1	IgG1 гуманизированное
Диагностика	1996	Cytogen	<sup>111</sup> In-capromab pendetide (Prostascint <sup>®</sup> )	PSMA	Конъюгат с изотопом индия-111
	1999	Immunomedics	<sup>99m</sup> Tc –arcitumomab (CEA-Scan <sup>®</sup> )	CEA	Конъюгат с изотопом технеция-99
Аутоиммунные заболевания	2003	CAT, Abbott	Adalimumab (Humira <sup>®</sup> )	TNF $\alpha$	IgG1 человека
	2008	UCB/Schwartz	Certolizumab pegol (Cimzia <sup>®</sup> )	TNF $\alpha$	Пегилированные гуманизированные Fab
	2004	Genentech	Omalizumab (Xolair <sup>®</sup> )	IgE	IgG1 гуманизированное
	2003	Genentech/Merck	Efalizumab (Raptiva <sup>®</sup> )	LFA-1	IgG1 гуманизированное
	2016	TEVA Respiratory	Reslizumab (Cinqair <sup>®</sup> )	IL-5	IgG1 гуманизированное
Сердечно-сосудистые заболевания	1994	Centocor/Lilly	Abciximab (ReoPro <sup>®</sup> )	Комплекс гликопротеинов IIb-IIIa	Fab химерный IgG1
Инфекционные заболевания	2016	Merck	Bezlotoxumab (Zinplava <sup>®</sup> )	токсин <i>TcdB</i> <i>Clostridium difficile</i>	IgG1 человека
Офтальмология	2015	Genentech/Novartis	Lucentis <sup>®</sup> (Ranibizumab)	VEGF-A	Fab-гуманизированные

**Форматы рекомбинантных антител.** Развитие рекомбинантных технологий позволяет создавать огромное разнообразие антител и их фрагментов даже тех, которые не встречаются в природе. Модульная структура иммуноглобулинов позволяет в зависимости от поставленных задач и целей исследования реализовывать набор функций, связанных с конкретным доменом, изолируя его или комбинируя с другими модулями (рис. 1).

Молекула иммуноглобулина условно может быть разделена на две функциональные субъединицы – *Fab* (fragment antigen binding – антигенсвязывающий фрагмент) и *Fc* (fragment crystallizable region – кристаллизующегося фрагмента антитела) фрагменты. *Fc* фрагмент состоит из двух пар

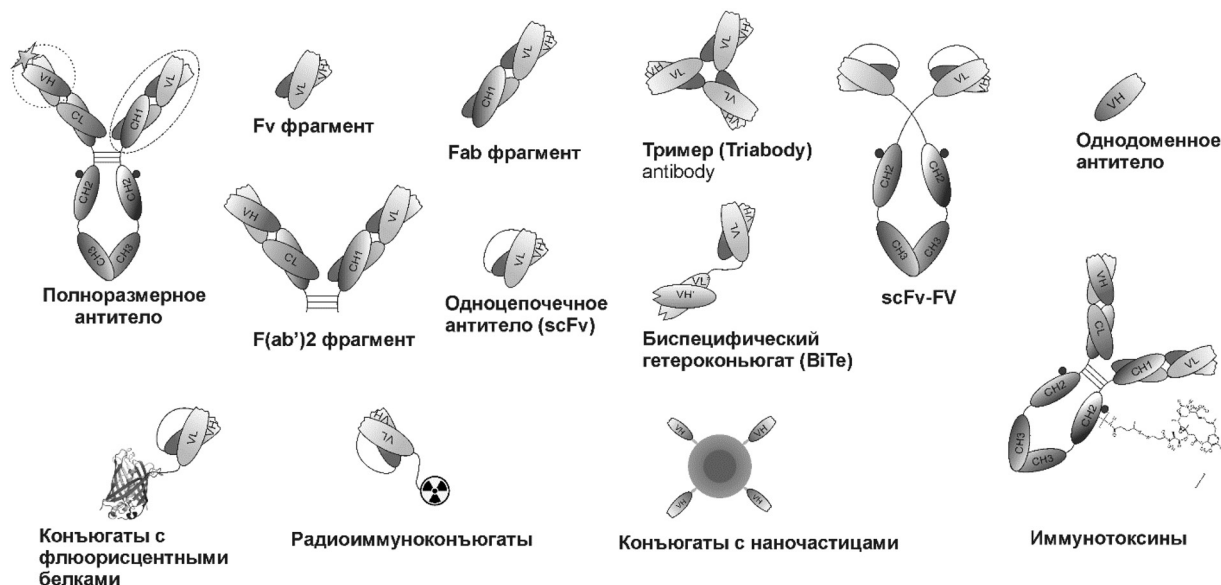


Рис. 1. Рекombинантные антитела, их фрагменты и конъюгаты

Fig. 1. Recombinant antibody fragments and conjugates

константных доменов (CH2 и CH3) и отвечает за взаимодействие с клеточными рецепторами при активации иммунного ответа, а также с белками системы комплемента. *Fab* фрагмент участвует в распознавании антигена и состоит из одного переменного участка (VL и VH) и одного константного (CL и CH1). Между собой отдельные полипептидные цепи связаны дисульфидными связями и нековалентными взаимодействиями [7]. Кроме того, на уровне CH2 участка молекула гликозилирована.

Первыми укороченными антителами стали *Fab* фрагменты антител, полученные удалением *Fc* фрагмента иммуноглобулинов класса G с помощью протеолитических ферментов [8]. Полученные фрагменты сохраняют структурную стабильность в растворе и антигенсвязывающие свойства исходных антител. Кроме того, почти втрое меньший по сравнению с полноформатным антителом размер мономерного *Fab* фрагмента обеспечивает лучшее проникновение в клетки при терапевтическом применении. Примером применения подобных вариантов антител является Lucentis® (Ranibizumab) – препарат для лечения возрастной дегенерации сетчатки глаза, который получают в виде рекомбинантных *Fab* фрагментов в бактериальной системе *E. coli* [9].

По настоящему широкое распространение модифицированные форматы антител получили с развитием методов генетической инженерии. Одноцепочечные переменные фрагменты антител, *scFv* (single chain variable fragments – одноцепочечные переменные фрагменты) представляют собой VH и VL домены, ковалентно связанные гибким пептидным линкером, в роли которого наиболее часто выступает аминокислотная последовательность (GGGGS)<sub>3</sub> [10]. Вследствие малого размера (28 кДа) и отсутствия *Fc* домена, *scFv* антитела обладают относительно высокой проникающей способностью и малым временем полувыведения из организма, что в случае их терапевтического использования в виде радиоиммуноконъюгатов или иммунотоксинов является определенным преимуществом [11]. Самостоятельно *scFv* фрагменты не способны активировать систему комплемента, а также вызывать антителозависимую клеточную цитотоксичность. При этом отказ от использования двух фундаментальных систем защиты организма от инородных клеток и злокачественных образований в большинстве случаев является нежелательным эффектом с точки зрения терапевтического применения, поэтому чаще всего узнающий модуль перспективных кандидатов получают в формате полноформатных антител либо в виде сшитых белковых комплексов.

Методы генетической инженерии позволяют получать сшитые белковые комплексы антител как для исследовательских нужд – визуализация, повышение уровня экспрессии, так и для

терапии и диагностики – расширение эффекторных функций и системы детекции. Например, цитокин – интерлейкин-2 – активирует антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ), положительно сказываясь на терапевтическом эффекте моноклональных антител [12]. Совместное применение этих препаратов осложняется побочными эффектами высоких доз интерлейкина-2 и необходимостью его использования в высоких концентрациях [13]. Антитела с такими иммуностимуляторными цитокинами, как интерлейкин-2, интерлейкин-12, ГМ-КСФ (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), могут быть получены в виде сшитых белковых комплексов, что повышает их локальную концентрацию в микроокружении опухолевых клеток, снижая системные побочные эффекты [14, 15].

Визуализация антител с помощью сшитых белковых комплексов находит применение как в прикладных задачах (иммуногистохимия), так и в научных исследованиях для создания новых антигенузнающих модулей и оптимизации процесса их получения [16].

С целью оптимизации и визуализации процесса экспрессии рекомбинантных антител нами сконструирован новый сшитый белковый комплекс *Fab* и *scFv* фрагментов антител с гемопротеидом – цитохромом  $b_5$ , который, благодаря характеристическому спектру поглощения, позволяет детектировать процесс выделения и очистки антител, измерять их концентрацию спектрофотометрически в сложных смесях, а также оценивать значение окислительно-восстановительного потенциала их окружения (рис. 2) [17].

Комплекс *Fab* и *scFv* сохраняет антигенсвязывающую активность антитела, спектральные характеристики гемопротеина, а также характеризуется троекратным увеличением выхода рекомбинантного белка по сравнению с не сшитыми с цитохромом  $b_5$  рекомбинантными антителами [17].

Наименьшим фрагментом, способным связывать антигены на сегодняшний день, являются однодоменные антитела, в которых узнающий модуль представляет собой одиночный домен тяжелой цепи VH, который, несмотря на отсутствие легкой цепи, сохраняет способность аффинно и специфично связывать низко- и высокомолекулярные антигены. Впервые однодоменные антитела были получены из иммуноглобулинов класса млекопитающих рода *Camelidae*, в сыворотке крови которых были обнаружены иммуноглобулиноподобные молекулы с отсутствующей легкой цепью [18]. Кроме этого, однодоменные антитела  $V_{NAR}$  (Variable New Antigen Resceptor – новый варибельный антигенный рецептор) найдены у многих хрящевых рыб, таких как акулы. Они существенно отличаются по свойствам и структуре как от варибельных доменов антител человека, так и от однодоменных антител ламы, в первую очередь более длинными антигенсвязывающими петлями, стабилизированными большим количеством дисульфидных связей [19].

На сегодняшний день существуют технологии получения однодоменных антител человека с применением технологии фагового дисплея, когда протяженные гидрофобные участки VH домена,

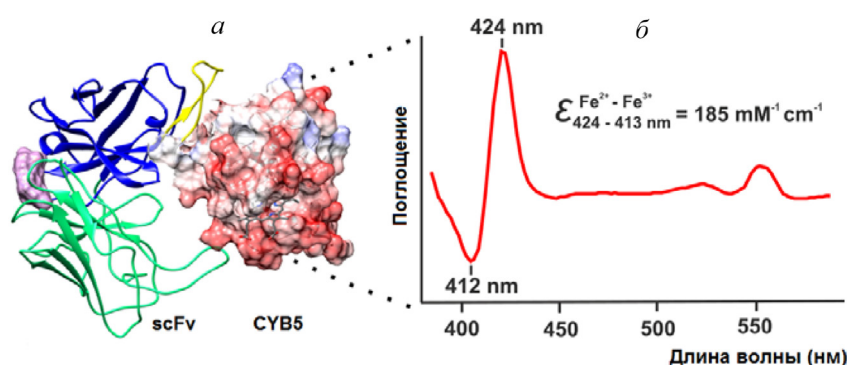


Рис. 2. Молекулярная модель *scFv-b5* сшитого белка (а); разностный спектр поглощения – окисленный/восстановленный *scFv-b5* (б)

Fig. 2. Model of the fusion protein built using *in silico* analyses (a); difference absorption spectrum (oxidized/reduced) of purified *scFv-b5* (b)

участвующие в природных антителах в связывании VL домена, заменяются на гидрофильные участки, гомологичные соответствующим областям VH домена антител ламы [20]. Более простая структура по сравнению с *scFv* фрагментами обеспечивает большую стабильность однодоменных антител, что, несомненно, является значительным преимуществом практически во всех областях их использования, а меньший размер (15 кДа) позволяет расширить область их терапевтического применения за счет большей проникающей способности данного антитела в клетку. В связи с этим сразу несколько терапевтических препаратов на основе однодоменных антител в настоящее время проходят доклинические и клинические испытания [21–24]. В исследованиях и диагностике большие надежды возлагаются на конъюгаты однодоменных антител с наночастицами, например с квантовыми точками для *in vivo* визуализации и терапии опухолевых заболеваний – тераностики [25, 26].

Известно значительное количество альтернативных антигенсвязывающих молекул неиммуноглобулиновой природы, которые охватывают различные белковые семейства и варианты укладки цепей – фибронектиновый домен, липокалин, белок А, анкириновые повторы, PDZ-домены [27–29]. Отбор аффинных вариантов осуществляется дисплейными методами, например используя комбинаторные фаговые библиотеки. Потенциально альтернативные каркасные белки могут расширить терапевтическую применимость антител и их фрагментов за счет малого размера и высокой стабильности в редокс-активном внутриклеточном окружении в случае связывания внутриклеточных мишеней. В данный момент проходят клинические испытания реагенты для *in vivo* диагностики и визуализации опухолевых заболеваний [30].

**Технологии получения.** Главным фактором, сдерживающим широкое использование антител в терапии и диагностике, долгое время являлась невозможность получения продуцирующих индивидуальные антитела клеточных линий, способных расти в культуре продолжительное время. Это затруднение было решено Жоржем Келером и Сезаром Мильштейном в 1975 г. в предложенной ими гибридомной технологии, отмеченной Нобелевской премией по физиологии в 1984 г. [31].

Основная идея гибридомной технологии заключается в слиянии В-лимфоцитов, продуцирующих антитела, с миеломными клетками, обладающими способностью к неограниченному делению с последующим отбором на селективной среде гибридных клеток – гибридом. Полученные гибридомы наследуют способность синтезировать моноклональные антитела от В-лимфоцитов и неограниченно делиться от миеломных клеток. Гибридомная технология совершила прорыв в иммунологической индустрии, благодаря ей возникли совершенно новые средства диагностики, новые способы изучения многих заболеваний, а также средства для их терапии.

Технология рекомбинантных ДНК расширила возможности гибридомной технологии, сделав возможным клонирование генов, кодирующих легкую и тяжелую цепи антител, продуцируемых гибридомами [32, 33]. Это позволяет получать фрагменты антител в бактериальной системе *E. coli* и изменять такие свойства антител, как аффинность и авидность, число и специфичность паратопов, состав доменов, подвижность молекулы, молекулярную массу, изоэлектрическую точку и потенциальную иммуногенность [34, 35].

Высокая степень гетерогенности нуклеотидных последовательностей, кодирующих иммуноглобулины, обуславливаемая их биологической функцией и механизмом генерации, зачастую осложняет задачу их клонирования, когда исследователю неизвестна точная последовательность фланкирующей области гена интереса [11]. Существует ряд подходов к клонированию генов, кодирующих иммуноглобулины, однако в ряде случаев вследствие соматических мутаций в FRI регионе переменных генов их амплификация со стандартными олигонуклеотидными праймерами становится невозможной [36].

Нами проведено множественное выравнивание всех имеющихся в базе данных IMGT (International ImMunoGeneTics information system – [www.imgt.org](http://www.imgt.org)) нуклеотидных последовательностей тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов мыши и на основании анализа этих данных сконструированы олигонуклеотидные праймеры для амплификации высоковариабельных генов иммуноглобулинов мыши, комплементарных не менее чем на 94% известным нуклеотидным последовательностям. Это позволило с высокой эффективностью провести клонирование антител

к кортизолу и тиреопероксидазе человека – ТПО (КФ 1.11.1.8) и получить *in vivo* биотинилированные *Fab* и *scFv* фрагменты этих антител [37]. Рекомбинантные *Fab* и *scFv* фрагменты антител к кортизолу не отличаются по аффинности и специфичности от полноразмерных родительских, в то время как *Fab* и *scFv* к ТПО обладают, к сожалению, чрезвычайно низкой стабильностью, что ограничивает их использование в иммунохимических системах без дополнительных модификаций. Это свидетельствует о том, что не всегда возможно манипулировать модульной структурой полноразмерных антител без ущерба для их физико-химических свойств.

На сегодняшний день созданы гибридные линии, продуцирующие антитела к широкому кругу мишеней. Технология разработана и описана достаточно полно и получение аффинных антител практически к любым высоко- и низкомолекулярным мишеням стало рутинной процедурой [38]. Несмотря на это, иммунизация лабораторных животных требует значительных временных затрат и зачастую не позволяет получать антитела к неиммуногенным или токсичным мишеням. Серьезным ограничением терапевтического применения моноклональных антител, полученных по этой технологии, является их иммуногенность для человека. Ввиду детерминированности условий отбора В-лимфоцитов в ходе иммунизации отсутствует возможность осуществлять селективное давление на этот процесс – получение антител с заданной кросс-специфичностью, антител к определенным конформационным эпитопам белков, к нативным белковым комплексам становится трудновыполнимой задачей.

Ведущей технологией получения рекомбинантных антител на сегодняшний день являются дисплейные методы, в частности метод фагового дисплея [39]. В процессе селекции антител методами фагового дисплея отбор аффинных вариантов проходит *in vitro*, что позволяет контролировать такие параметры процесса, как значения рН, ионной силы, наличие детергентов и хаотропных агентов, время и температуру инкубации, осуществлять негативную селекцию [40]. Это позволяет значительно ускорять процесс генерации антигенсвязывающего клона и получать антитела заданной эпитопной специфичности и кросс-реактивности практически к любым мишеням без участия лабораторных животных [41].

**Фаговый дисплей как универсальный инструмент поиска аффинных молекул с заданными характеристиками.** Наиболее полно разработанным дисплейным методом является метод фагового дисплея, совмещающий в себе *in vitro* и *in vivo* стадии отбора наиболее аффинных вариантов антител. Основой методологии фагового дисплея послужили эксперименты Г. Смита в 1985 г., в ходе которых короткие фрагменты эндонуклеазы рестрикции *EcoRI* были экспрессированы на поверхности капсида нитчатого бактериофага M13 вместе с другими белками оболочки вирусной частицы [39]. Это стало возможным вследствие встраивания гена, кодирующего этот фрагмент, в геном бактериофага в единую рамку считывания с белком g3p оболочки фага M13.

Таким образом была достигнута связь между «фенотипом» – экспонированным на поверхности фаговой частицы полипептидом и «генотипом» – геном, кодирующим его структуру. Эта связь является фундаментальной основой метода фагового дисплея – отбор генетических вариантов полипептидов по свойствам транслируемых белков [42].

Вместо того чтобы экспрессировать и анализировать различные генетически сконструированные варианты рекомбинантных антител, появляется возможность одновременно анализировать пул фагов, содержащий до  $10^{11}$  независимых фаговых частиц с различными вариантами антител на поверхности, которые могут быть сконструированы одновременно. Такие библиотеки позволяют легко отбирать фаговые частицы, на поверхности которых экспрессируется белок с наибольшей аффинностью и специфичностью по отношению к интересующему антигену. После каждого раунда селекции к антигену библиотека обогащается специфическими антителами.

После селекции наиболее аффинные и специфичные антитела могут быть легко сконвертированы в полноформатные антитела для наделения их эффекторными функциями или использованы для создания химерных конструкций для научно-исследовательских, диагностических или терапевтических применений [43].

Для отбора из комбинаторных библиотек специфических антител проводят процедуру биопэнинга – аффинного обогащения библиотеки антителами, направленными к целевому

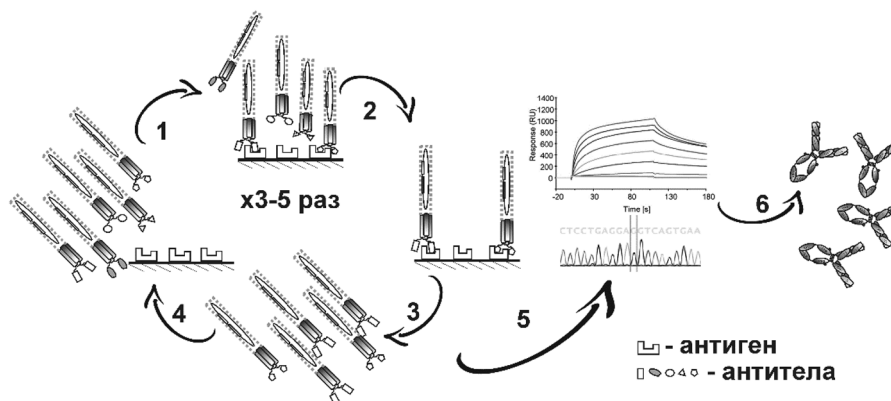


Рис. 3. Схема биопэнинга: 1 – инкубация библиотеки с иммобилизованной мишенью, 2 – отмывка низкоаффинных вариантов, 3 – амплификация высокоаффинных вариантов, 4 – инкубация вторичной амплифицированной библиотеки, 5 – анализ клонов, 6 – наработка антител

Fig. 3. Biopanning scheme (1 – phage display library incubation with immobilized antigen, 2 – poor binders washing, 3 – strong binders amplification, 4 – enriched secondary library incubation, 5 – antibodies analysis, 6 – antibodies expression and purification)

антигену. Для этого в одном из вариантов данной процедуры иммобилизованный антиген инкубируют с фаговой библиотекой, затем не связавшиеся антитела удаляют, а связавшиеся элюируют и используют для инфицирования клеток. Нароботанные в *E. coli* бактериофаги выделяют и используют для следующего раунда биопэнинга (рис. 3). Обогащенную библиотеку используют для отбора индивидуальных антител, направленных к целевому антигену [44].

Первым препаратом терапевтического антитела, полученным с помощью данной технологии, является Adalimumab (Humira<sup>®</sup>) – бестселлер фармацевтического рынка с ежегодным объемом продаж более 13 млрд дол. США, что стало наглядным подтверждением возможностей этой технологии.

В зависимости от подхода, который лежит в основе создания разнообразия нуклеотидных последовательностей, и, как следствие, свойств экспонируемых антител все фаговые библиотеки можно разделить на натуральные, где разнообразные переменные фрагменты получены из сыворотки крови иммунизированных или неиммунизированных доноров и синтетические (комбинаторные), в которых разнообразие в переменные фрагменты антител вводится в ходе *in vitro* процедур чаще всего методами ПЦР и сайт-направленного мутагенеза [45]. К натуральным библиотекам относятся так называемые «иммунные» (immune) и «наивные» (naïve) библиотеки.

*Иммунные библиотеки* создаются на основе мРНК периферических лимфоцитов доноров, иммунизированных каким-либо антигеном [46]. Вследствие уже прошедшего аффинного созревания они обогащены антителами к антигену, которым была произведена иммунизация, что облегчает выделение высокоаффинных вариантов. Разнообразие подобных библиотек составляет  $10^5$ – $10^7$  клонов и этого в большинстве случаев достаточно для получения целевых антител [45]. К тому же незначительный размер библиотеки технически упрощает работу с ней. Основным недостатком использования иммунных библиотек является необходимость проведения процедуры иммунизации и создания библиотеки каждый раз для различных антигенов. Кроме этого, с использованием иммунных библиотек невозможно получать антитела к токсичным и иммуносупрессорным антигенам, а также антигенам к аутоантигенам. В случае терапевтического интереса к получаемым антителам требуется трудоемкая процедура гуманизации изолированных антител. Исключением является выделение антител с использованием доноров, имеющих аутоиммунные, онкологические и вирусные заболевания [47, 48].

*«Наивные» библиотеки* конструируются на основе мРНК периферических В-лимфоцитов группы неиммунизированных доноров, вследствие чего одна библиотека может служить источником антител к большому количеству антигенов [49]. Отпадает необходимость в процедуре иммунизации и становится возможным получение антител к токсичным и неиммуногенным мишеням.

Основным недостатком по сравнению с иммунными библиотеками является невысокая (чаще всего микромолярная) аффинность изолированных антител, что требует дополнительных процедур *in vitro* аффинного созревания – создания вторичных библиотек и сайт-направленного мутагенеза; зачастую возможны проблемы с экспрессией и стабильностью отобранных вариантов.

Накопление данных о структуре иммуноглобулинов и их антигенсвязывающих участков позволили выяснить вклад отдельных пространственных структур и аминокислот в аффинное взаимодействие. Эти знания позволяют конструировать *синтетические* (комбинаторные) библиотеки с заданными физико-химическими свойствами и искусственно введенным аминокислотным разнообразием [50]. Библиотеки такого вида имеют ряд существенных преимуществ. Использование синтетических библиотек способно сильно расширить их разнообразие, так как снимаются ограничения, связанные с иммунным происхождением пула антител. Это теоретически позволяет отбирать высокоаффинные антитела (пико- и наномолярных аффинностей) к любым антигенам – консервативным белкам, неиммуногенным или токсичным веществам. Становится возможным получение антител, специфично распознающих различные посттрансляционные модификации и конформации одного и того же белка. Единоразово сконструированная синтетическая библиотека может служить источником антител к сотням различных антигенов, включая аутоантигены, существенно сокращая временные и экономические затраты. Использование каркасных участков антител, обладающих низкой иммуногенностью и высокой стабильностью в растворах, позволяет изолировать клоны антител, обладающие необходимыми для терапевтического применения физико-химическими и иммунобиологическими свойствами [51].

Существует несколько основных подходов к созданию подобных библиотек, в зависимости от чего выделяют полусинтетические и полностью синтетические библиотеки.

*Полусинтетические* библиотеки конструируются на основании случайных комбинаций между хорошо экспрессирующимися и стабильными семействами VH и VL (такими как, например, VH-DP47, Vk-DPL3) с введенным в участки, опосредующие большинство взаимодействий с антигеном (CDR – complementary determining regions) дополнительным аминокислотным разнообразием. Таким образом, выбрав в качестве шаблона стабильное антитело необходимой видовой принадлежности – каркас, которое хорошо экспрессируется в клетках продуцента, и введя в его структуру заранее продуманное разнообразие последовательностей антигенсвязывающих областей, можно получить библиотеку антител с заданной структурой каркасного участка, но с различным сродством к разным антигенам. Последующие стадии селекции и при необходимости *in vitro* аффинного созревания делают рутинной операцию получения антител с наномолярной или даже пикомолярной аффинностью [52].

Ряд антител к широкому разнообразию мишеней (тиреопероксидаза, цитохромы P450, лактоферрин, кортизол, эритропоэтин, соматотропный гормон) получен нами с использованием монокаркасной синтетической библиотеки однодоменных антител. Суперпозиция структур этих антител (получены *in silico* методами молекулярного моделирования) показывает крайне высокую вариативность CDR3 петли, опосредующей большее количество взаимодействий с антигеном и рандомизированной по длине, и высокую стабильность каркаса (рис. 4, а).

Кроме этого, разнообразие CDR3 покрывает до 80% поверхности паратопа (рис. 4, б). Все изолированные клоны к разным мишеням сохраняют более чем 85% идентичность первичной последовательности и третичной структуры, что обуславливает подобие физико-химических свойств этих антител и значительно упрощает работу с ними.

В простейшем случае диверсификация осуществляется введением всего разнообразия аминокислотных остатков в CDR с помощью вырожденных кодонов NNK/NNS, которые покрывают все 20 основных аминокислот [53]. Данный способ диверсификации является наименее эффективным – многие клоны антител склонны к агрегации и не способны эффективно связывать антигены в виду большого количества нехарактерных для CDR аминокислотных остатков, таких как цистеин, изолейцин, метионин. Тем не менее подобные библиотеки, как, например, *Tomlinson I+J library*, могут являться источником высокоаффинных и специфичных клонов антител для научных исследований [54, 55].



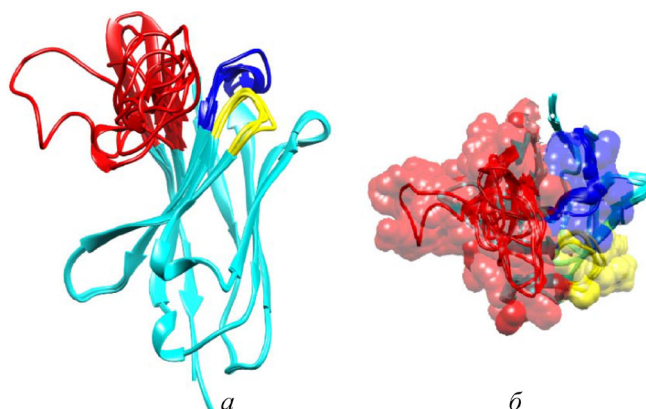


Рис. 4. Суперпозиция однодоменных антител, изолированных из библиотеки, созданной на основе одного каркаса: (*a* – вид сбоку, *б* – вид сверху, жёлтые петли – CDR1, синие – CDR2, красные – CDR3)

Fig. 4. Single-domain antibodies structures from single framework library, superposition (*a* – front view, *б* – side view, yellow loops – CDR1, blue loops – CDR2, red loops – CDR3)

Наиболее совершенным методом диверсификации является использование синтетических тринуклеотидов, что позволяет создавать библиотеки со строго контролируемым разнообразием аминокислотных остатков в каждой позиции и их соотношением, исключая присутствие таких аминокислот, как, например, цистеин и пролин в антигенсвязывающем сайте, и увеличивая количество ароматических и заряженных аминокислот, опосредующих большое количество взаимодействий [50].

В полностью синтетических библиотеках синтезируется ряд каркасных (FR – framework regions) участков, чередующихся с полностью рандомизированными CDR участками [56]. Наличие нескольких каркасных участков в совокупности с *in silico* сконструированными CDR участками позволяет одновременно покрыть все канонические классы антител и оптимизировать их структуру для достижения высокого уровня экспрессии в бактериальной системе и дисплея на поверхности бактериофагов.

Для определения аминокислотного разнообразия CDR участков антител, прошедших все стадии аффинного созревания, нами были проанализированы структуры разрешенных комплексов антител с антигенами, входящими в базу данных RCSF PDB (<http://www.rcsb.org/>, дата доступа 01.07.2016). Из более чем 120 тысяч структур 2,5 тысячи составляют антитела и их фрагменты. Наиболее представлены антитела в комплексе с белковыми молекулами (1112 депонированных структур) и пептидами (322). Антитела с низкомолекулярными веществами (176), углеводами (86) и нуклеиновыми кислотами (16) встречаются значительно реже.

После извлечения последовательностей CDR участков антител с помощью оригинального программного комплекса, написанного на языке Python, нами была определена общая частота включения различных аминокислотных участков в каждую из CDR петель (рис. 5).

Наиболее представлены в антигенсвязывающем участке аминокислотные остатки серина (S), тирозина (Y), глицина (G) и аспарагиновой кислоты (D). Возможно, тирозин и аспарагиновая кислота наилучшим образом подходят для реализации молекулярного узнавания [57], что и обуславливает селективное давление в ходе эволюции иммунной системы, которое привело к их преобладанию в данных регионах, а небольшие боковые цепи серина и глицина позволяют оптимальным образом разместить их в пространстве паратопа [58, 59].

На основании этой информации нами сконструирована синтетическая библиотека *Fab* фрагментов антител с серин\тирозин разнообразием во всех CDR. В CDR-H3 и CDR-L3 как наиболее значимые с точки зрения взаимодействий с антигенами было введено дополнительное разнообразие, кроме этого они были рандомизированы по длине (от 4 до 17 аминокислотных остатков).

Разнообразие (количество различных клонов антител в библиотеке) созданной библиотеки лимитируется эффективностью процесса переноса созданных синтетических генетических конструкций в клетки *E. coli*. Наиболее приемлемым на сегодняшний день является метод электро-

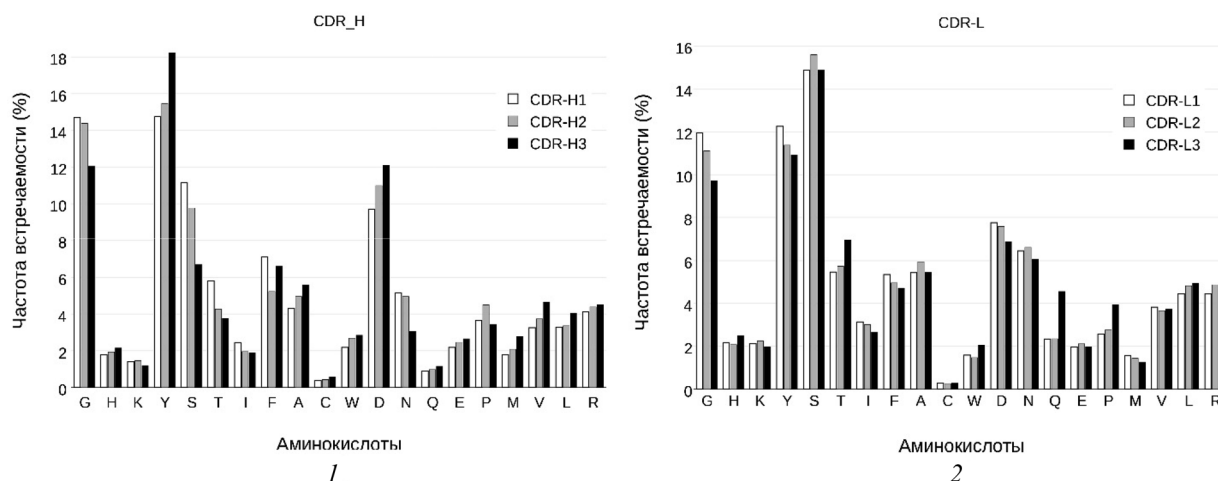


Рис. 5. Частота включения различных аминокислотных остатков по CDR последовательностям тяжелой (1) и легкой (2) цепей иммуноглобулинов

Fig. 5. Amino Acids diversity in CDR sequences of heavy (1) and light (2) chains of immunoglobulins

порации [60], эффективность которого на несколько порядков превышает эффективность химических методов. Так как теоретическое разнообразие, вводимое нами в CDR петли *Fab* фрагмента, составляет порядка  $10^{16}$  и значительно превышает достигнутую эффективность электропорации ( $1,2 \cdot 10^{10}$  КОЕ/мкг ДНК), можно сделать вывод, что большинство вариантов антител присутствует в ней в единственном числе, а значит, разнообразие библиотеки составляет порядка  $10^{10}$ – $10^{11}$ , что в большинстве случаев достаточно для получения высокоаффинных клонов антител с заданными свойствами.

Такой подход позволил получить библиотеки, способные служить источником антител к сотням антигенов, многие из них недоступны для натуральных библиотек. Преимущества, которые дает использование дисплейных методов для получения рекомбинантных антител с широким диапазоном свойств, позволили внедрить такие антитела в многочисленные диагностические системы [61].

Одним из современных направлений биоинженерии антител является создание узнающих модулей с рН-зависимым связыванием для терапевтического применения [62]. Моноклональные антитела к мембранным белкам взаимодействуют с мишенью только один раз и утилизируются в эндосомах, что уменьшает период их полувыведения и повышает требуемые дозировки препарата. Для создания антител с рН-зависимым связыванием сконструированы комбинаторные фаговые библиотеки *scFv* фрагментов с увеличенным количеством остатков гистидина в антиген-связывающих петлях [63]. Гистидин ( $pK_a \sim 6,5$ ) при физиологических значениях рН не имеет заряда и потенциально способен опосредовать большое количество взаимодействий с антигеном (формирование водородных связей,  $\pi$ - $\pi$  стэкинг, катион- $\pi$  взаимодействия) [64]. В кислой среде эндосом боковая цепь гистидина приобретает положительный заряд и взаимодействие с антигеном нарушается, что приводит к высвобождению антител обратно в плазму, где может происходить новое взаимодействие с рецепторами или растворимыми антигенами [62].

**Использование негативной селекции для получения специфических антител к высокоомологичным антигенам.** Наиболее ценной особенностью применения дисплейных методов является возможность создания антител с заданными параметрами связывания – узнающих определенные конформационные состояния белков и способных их индуцировать, региоспецифические антитела к интересующим исследователя конформационным эпитопам, антитела, различающие высокоомологичные белки, а также антитела, узнающие белок-белковые комплексы и стабилизирующие белок-белковые взаимодействия [65, 66]. Это становится возможным благодаря применению негативной или позитивной селекции, когда библиотека антител предварительно обедняется или соответственно обогащается клонами, способными связывать антигены заданной структуры.

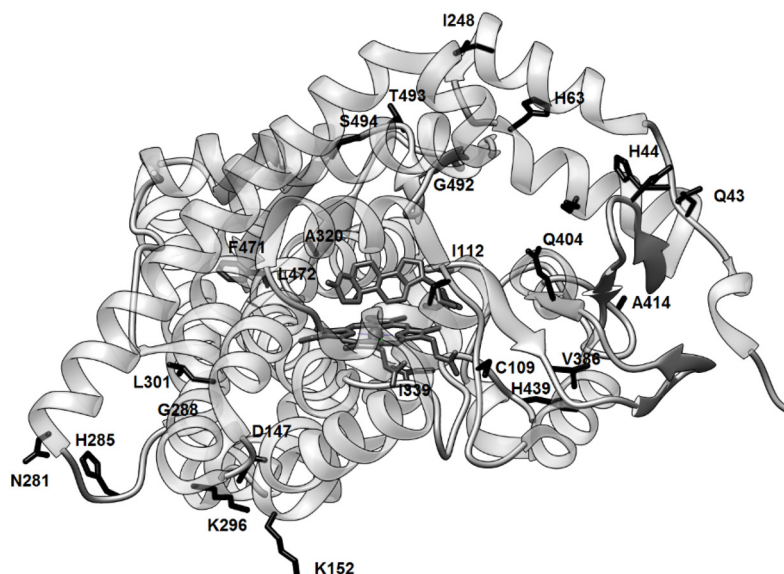


Рис. 6. Пространственная структура CYP11B2 (PDB ID: 4DVQ). Светло-серым цветом – укладка аминокислотной цепи, черным – аминокислотные остатки, отличающиеся от CYP11B1, темно-серым – гем и лиганд (11-дезоксикортикостерон)

Fig. 6. Spatial structure of CYP11B2 (PDB ID: 4DVQ). Light gray – laying of the amino acid chain, black – amino acid residues, different from CYP11B1, dark gray – heme and ligand (11-deoxy corticosterone)

С использованием подхода негативной селекции нами изолирован ряд клонов однодоменных антител человека заданной специфичности.

Цитохром P450 11B2 (альдостерон-синтаза) – CYP11B2 и цитохром P450 11B1 (стероид 11 $\beta$ -гидроксилаза) – CYP11B1 – ключевые ферменты биосинтеза минералокортикоидов и кортикостероидов [67]. Эти изоферменты обладают 93% идентичностью аминокислотной последовательности, однако этих нескольких аминокислотных замен достаточно для существенных функциональных отличий между ферментами [68].

Высокая степень идентичности последовательностей CYP11B2 и CYP11B1 затрудняет получение специфичных антител к конформационным эпитопам традиционной гибридной технологией (рис. 6).

Относительные успехи были достигнуты только при использовании линейных синтетических пептидов в качестве иммуногена, однако изучение молекулярных механизмов различий в каталитической активности изоферментов требует наличия антител к конформационным эпитопам [69].

Для получения рекомбинантных антител нами использована комбинаторная фаговая библиотека однодоменных антител человека. Разнообразие данной библиотеки составляет  $10^{10}$  независимых клонов, что сопоставимо с разнообразием В-лимфоцитов в иммунной системе. Это позволяет рассчитывать на получение антител с микро- и наномолярной аффинностью к белкам в *in vitro* системе в заданных условиях [18]. Данная библиотека сконструирована путем рандомизации CDR антигенсвязывающих петель с каркасного участка V3-23/D47 VH фрагмента антитела человека [19]. Такие антитела имеют ряд преимуществ как перед полноразмерными антителами, так и *Fab* и *scFv* фрагментами антител: малый размер (14 кДа), высокая термическая стабильность (сохраняют антигенсвязывающие свойства после нескольких циклов тепловой денатурации), высокий уровень экспрессии в бактериальной системе *E. coli*, возможность связывания антителами скрытых эпитопов и полостей.

С целью получения CYP11B2 специфических антител, не связывающих CYP11B1, нами был применен подход негативной селекции, заключающийся в предварительной инкубации библиотеки антител с иммобилизованным CYP11B1 для обеднения библиотеки клонами, обладающими нежелательной кросс-реактивностью. После четырех раундов биопэнинга 48 произвольно выбранных антител использовались для анализа связывания с CYP11B2 и CYP11B1 методом ИФА.

Согласно результатам ИФА, в пуле присутствуют как клоны антител, связывающие CYP11B1 и не связывающие CYP11B2, так и клоны с преобладающей аффинностью к CYP11B2 (рис. 7).

Анализ нуклеотидных последовательностей CDR-H3, определяющих уникальность клонов антител, показал существенное превалирование в фаговом пуле двух клонов, один из которых (G3) обладает необходимой антигенной специфичностью. Данное антитело было получено в бактериальной системе в препаративных количествах для анализа кинетических параметров связывания с антигеном.

Анализ кинетики взаимодействия с антигеном, проведенный с использованием метода биослойной интерферометрии на биосенсоре Blitz ForteBio [70], показал, что однодоменные антитела, иммобилизованные на protein A сенсоре, связывают CYP11B2 и CYP11B1 с практически идентичным значением  $k_{on}$ , однако отличаются по значению  $k_{off}$ , что, вероятно, и обуславливает отсутствие связывания в условиях проведения твердофазного иммуферментного анализа (рис. 8, а)

Одним из требований к получаемым антителам является специфичность к конкретному эпитопу – участку связывания с редокс-партнером адренодоксином (Adx). Для анализа влияния присутствия Adx на взаимодействие антитела с CYP11B2 иммобилизованные на protein A сенсоре антитела G3 помещали в растворы CYP11B2, содержащие различное молярное соотношение Adx к CYP11B2 (от 2:1 до 1:2). Из представленных на сенсограмме данных видно, что повышение концентрации Adx в растворе уменьшает количество CYP11B2 связывающегося на сенсоре, что свидетельствует о конкурентном ингибировании этого связывания (рис. 8, б).

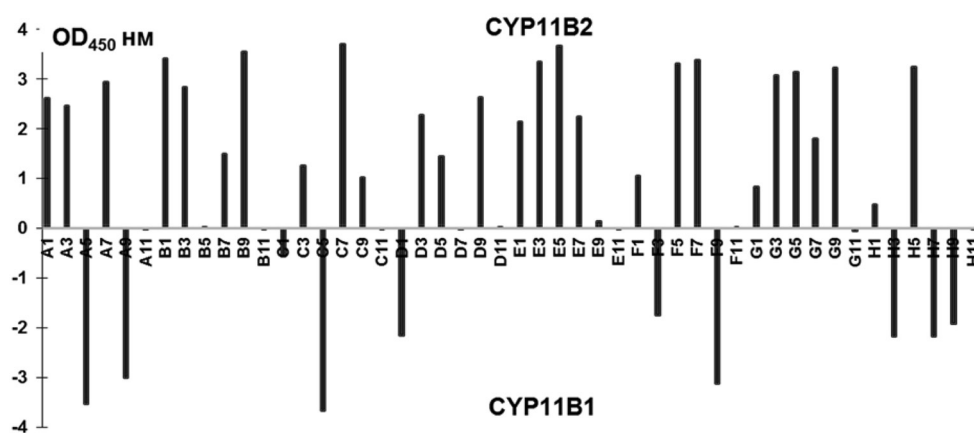


Рис. 7. Результаты ИФА скрининга клонов, полученных в результате селекции антител к CYP11B2 с негативной селекцией на CYP11B1

Fig. 7. ELISA data of anti-CYP11B2/CYP11B1 antibodies negative selection

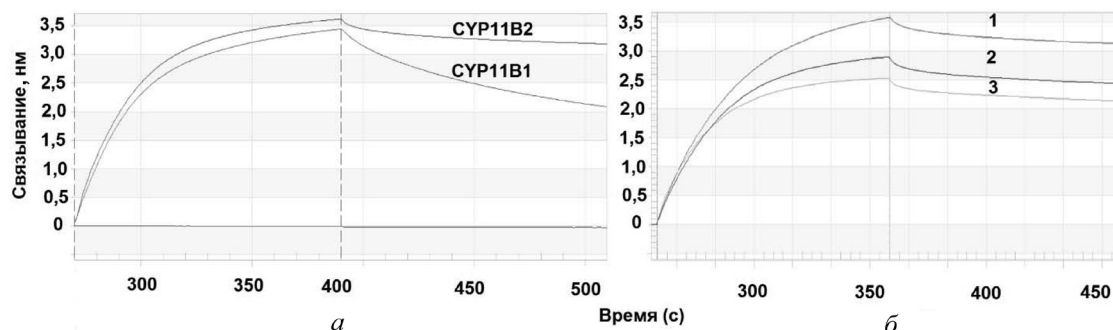


Рис. 8. Сенсограмма взаимодействия CYP11B2 и CYP11B1 с антителом G3, иммобилизованным на биосенсоре (а); взаимодействия CYP11B2 (1 нМ) с антителом G3 в присутствии различных концентраций адренодоксина (1 – 0 нМ; 2 – 0,5 нМ; 3 – 2 нМ) – (б)

Fig. 8. Sensogram of antibody G3 – CYP11B2/CYP11B1 interaction – (а); interaction of CYP11B2 (1 nM) and G3 antibody in the presence of adrenodoxin (1 – 0 nM; 2 – 0.5 nM; 3 – 2 nM) – (б)

**Выводы.** С применением дисплейных методов создание антител с аффинностью до  $10^{-12}$  М становится обыденной процедурой. Значения аффинности могут значительно превосходить таковые у антител, полученных с применением иммунизации, так как они ограничены  $\sim 10^{-10}$  М вследствие природного механизма активации В-лимфоцитов.

Тщательный контроль условий скрининга и селекции в дисплейных методах позволяет отбирать антитела специфичные к различным конформациям и эпитопам антигена, что находит применение в научно-исследовательских и диагностических целях. Перспективным представляется использование, связанное со специфичным узнаванием белка с определенными посттрансляционными модификациями, единичными аминокислотными заменами или в определенном конформационном состоянии.

Привлекательной является возможность полного отказа от трудозатратной гибридной технологии, когда с использованием фагового дисплея и методов генетической инженерии появляется возможность клонировать гены антител, используя образцы крови иммунизированных доноров. Синтетические библиотеки позволяют упростить и эту процедуру, используя в высокопроизводительном скрининге всего лишь одну библиотеку для поиска аффинных вариантов антител.

На сегодняшний день проходят клинические испытания более 60 препаратов терапевтических антител, полученных с помощью фагового дисплея, однако практически все узнающие модули были получены всего несколькими компаниями – MorphoSys, Dyax, Cambridge Antibody Technology, имеющими в своем портфолио комбинаторные библиотеки антител, такие как Ylanthia<sup>®</sup>, HuCAL<sup>®</sup>, однако они коммерчески недоступны ни для академических институтов, ни для фармацевтических предприятий [51, 71, 72]. Это делает необходимым освоение данной технологии и конструирование собственных комбинаторных библиотек антител.

Значительный опыт работы в области белковой инженерии и биоинформатики позволил создать в Институте биоорганической химии НАН Беларуси ряд технологических платформ для получения рекомбинантных антител методами фагового дисплея. С использованием негативной селекции для удаления вариантов антител, обладающих нежелательной кросс-реактивностью, были получены аффинные антитела к ряду мишеней, имеющих прикладное значение – альдостерон-синтазе, эритропоэтину, соматотропному гормону, тиреопероксидазе человека.

#### Список использованных источников

1. Recent advances in the application of antibodies as therapeutics / R. E. Burden [et al.] // *Future Med. Chem.* – 2012. – Vol. 4, № 1. – P. 73–86.
2. Antibodies in diagnostics – from immunoassays to protein chips / C. A. Borrebaeck // *Immunol. Today.* – 2000. – Vol. 21, № 8. – P. 379–382.
3. Rodgers, K. R. Therapeutic monoclonal antibodies and derivatives: Historical perspectives and future directions / K. R. Rodgers, R. C. Chou // *Biotechnol. Adv.* – 2016. – Vol. 34, № 6. – P. 1149–1158.
4. Ecker, D. M. The therapeutic monoclonal antibody market / D. M. Ecker, S. D. Jones, H. L. Levine // *MAbs.* – 2015. – Vol. 7, № 1. – P. 9–14.
5. Antibodies for profiling the human proteome-The Human Protein Atlas as a resource for cancer research / A. Asplund [et al.] // *Proteomics.* – 2012. – Vol. 12, № 13. – P. 2067–2077.
6. Towards a knowledge-based Human Protein Atlas / M. Uhlen [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 28, № 12. – P. 1248–1250.
7. Buchner, J. Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in *Escherichia coli* / J. Buchner, R. Rudolph // *Biotechnology (N Y).* – 1991. – Vol. 9, № 2. – P. 157–162.
8. Rousseaux, J. Optimal conditions for the preparation of Fab and F(ab')<sub>2</sub> fragments from monoclonal IgG of different rat IgG subclasses / J. Rousseaux, R. Rousseaux-Prevost, H. Bazin // *J. Immunol. Methods.* – 1983. – Vol. 64, № 1–2. – P. 141–146.
9. Gaudreault, J. Preclinical pharmacokinetics of Ranibizumab (rhuFabV2) after a single intravitreal administration / J. Gaudreault [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2005. – Vol. 46, № 2. – P. 726–733.
10. Single-chain antigen-binding proteins / R. E. Bird [et al.] // *Science.* – 1988. – Vol. 242, № 4877. – P. 423–426.
11. Recombinant Immunotoxin 4D5scFv-PE40 for Targeted Therapy of HER2-Positive Tumors / E. A. Sokolova [et al.] // *Acta Naturae.* – 2015. – Vol. 7, № 4. – P. 93–96.
12. Phase IB trial of chimeric antidiisialoganglioside antibody plus interleukin 2 for melanoma patients / M. R. Albertini [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 1997. – Vol. 3, № 8. – P. 1277–1288.
13. Vial, T. Immune-mediated side-effects of cytokines in humans / T. Vial, J. Descotes // *Toxicology.* – 1995. – Vol. 105, № 1. – P. 31–57.

14. An anti-MUC1-antibody-interleukin-2 fusion protein that activates resting NK cells to lysis of MUC1-positive tumour cells / C. Heuser [et al.] // *Br. J. Cancer.* – 2003. – Vol. 89, № 6. – P. 1130–1139.
15. Penichet, M. L. An IgG3-IL-2 fusion protein recognizing a murine B cell lymphoma exhibits effective tumor imaging and antitumor activity / M. L. Penichet, E. T. Harvill, S. L. Morrison // *J. Interferon Cytokine Res.* – 1998. – Vol. 18, № 8. – P. 597–607.
16. Clementschitsch, F. Improvement of bioprocess monitoring: development of novel concepts / F. Clementschitsch, K. Bayer // *Microb. Cell Fact.* – 2006. – Vol. 5. P. 19.
17. Development of CYB5-fusion monitoring system for efficient periplasmic expression of multimeric proteins in *Escherichia coli* / D. Dormeshkin [et al.] // *Protein Expr. Purif.* – 2016. – Vol. 128. – P. 60–66.
18. The crystal structure of a llama heavy chain variable domain / S. Spinelli [et al.] // *Nat. Struct. Biol.* – 1996. – Vol. 3, № 9. – P. 752–757.
19. Structural insights and biomedical potential of IgNAR scaffolds from sharks / S. Zielonka [et al.] // *MAbs.* – 2015. – Vol. 7, № 1. – P. 15–25.
20. Rouet, R. Generation of human single domain antibody repertoires by Kunkel mutagenesis / R. Rouet, K. Dudgeon, D. Christ // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 907. – P. 195–209.
21. Camelid single-domain antibody-fragment engineering for (pre)clinical in vivo molecular imaging applications: adjusting the bullet to its target / J. De Vos [et al.] // *Expert Opin. Biol. Ther.* – 2013. – Vol. 13, № 8. – P. 1149–1160.
22. The preclinical pharmacology of the high affinity anti-IL-6R Nanobody(R) ALX-0061 supports its clinical development in rheumatoid arthritis / M. Van Roy [et al.] // *Arthritis Res. Ther.* – 2015. – Vol. 17. – P. 135.
23. Holz, J. B. The TITAN trial--assessing the efficacy and safety of an anti-von Willebrand factor Nanobody in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura / J. B. Holz // *Transfus. Apher. Sci.* – 2012. – Vol. 46, № 3. – P. 343–346.
24. Generation and Characterization of ALX-0171, a Potent Novel Therapeutic Nanobody for the Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection / L. Detalle [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2015. – Vol. 60, № 1. – P. 6–13.
25. Detection of carcinoembryonic antigen using single-domain or full-size antibodies stained with quantum dot conjugates / G. Rousserie [et al.] // *Anal. Biochem.* – 2015. – Vol. 478. – P. 26–32.
26. Schroeder, K. L. Graphene Quantum Dots for Theranostics and Bioimaging / K. L. Schroeder, R. V. Goreham, T. Nann // *Pharm. Res.* – 2016. – Vol. 33, № 10. – P. 2337–2357.
27. Directed evolution of PDZ variants to generate high-affinity detection reagents / M. Ferrer [et al.] // *Protein Eng. Des. Sel.* – 2005. – Vol. 18, № 4. – P. 165–173.
28. Hosse, R. J. A new generation of protein display scaffolds for molecular recognition / R. J. Hosse, A. Rothe, B. E. Power // *Protein Sci.* – 2006. – Vol. 15, № 1. – P. 14–27.
29. Sedgwick, S. G. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework / S. G. Sedgwick, S. J. Smerdon // *Trends Biochem. Sci.* – 1999. – Vol. 24, № 8. – P. 311–316.
30. Directed evolution to low nanomolar affinity of a tumor-targeting epidermal growth factor receptor-binding antibody molecule / M. Friedman [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 376, № 5. – P. 1388–1402.
31. Kohler, G. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity / G. Kohler, C. Milstein // *Nature.* – 1975. – Vol. 256, № 5517. – P. 495–497.
32. Ruberti, F. Cloning and expression of an anti-nerve growth factor (NGF) antibody for studies using the neuroantibody approach / F. Ruberti, A. Bradbury, A. Cattaneo // *Cell. Mol. Neurobiol.* – 1993. – Vol. 13, № 5. – P. 559–568.
33. An improved method for generating single-chain antibodies from hybridomas / P. J. Nicholls [et al.] // *J. Immunol. Methods.* – 1993. – Vol. 165, № 1. – P. 81–91.
34. Structure-based affinity maturation of a chimeric anti-ricin antibody C4C13 / L. Luo [et al.] // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2014. – Vol. 32, № 3. – P. 416–423.
35. Ikonomova, S. P. A simple and robust approach to immobilization of antibody fragments / S. P. Ikonomova, Z. He, A. J. Karlsson // *J. Immunol. Methods.* – 2016. – Vol. 435. – P. 7–16.
36. Toleikis, L. Cloning single-chain antibody fragments (ScFv) from hybridoma cells / L. Toleikis, A. Frenzel // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 907. № – P. 59–71.
37. Generation and characterization of biotinylated recombinant Fab antibody fragment against cortisol / D. O. Dormeshkin [et al.] // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* – 2016. – Vol. 42, № 1. – P. 7.
38. Tomita, M. Hybridoma technologies for antibody production / M. Tomita, K. Tsumoto // *Immunotherapy.* – 2011. – Vol. 3, № 3. – P. 371–380.
39. Smith, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface / G. P. Smith // *Science.* – 1985. – Vol. 228, № 4705. – P. 1315–1317.
40. Beyond natural antibodies: the power of in vitro display technologies / A. R. Bradbury [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 29, № 3. – P. 245–254.
41. Application of phage display to high throughput antibody generation and characterization / D. J. Schofield [et al.] // *Genome Biol.* – 2007. – Vol. 8, № 11. – P. R254.
42. Carmen, S. Concepts in antibody phage display / S. Carmen, L. Jermutus // *Brief. Funct. Genomic Proteomic.* – 2002. – Vol. 1, № 2. – P. 189–203.
43. Significant impact of single N-glycan residues on the biological activity of Fc-based antibody-like fragments / J. Jez [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287, № 29. – P. 24313–24319.
44. Watkins, N. A. Introduction to antibody engineering and phage display / N. A. Watkins, W. H. Ouwehand // *Vox Sang.* – 2000. – Vol. 78, № 2. – P. 72–79.

45. Griffiths, A. D. Strategies for selection of antibodies by phage display / A. D. Griffiths, A. R. Duncan // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 1998. – Vol. 9, № 1. – P. 102–108.
46. Making antibody fragments using phage display libraries / T. Clackson [et al.] // *Nature.* – 1991. – Vol. 352, № 6336. – P. 624–628.
47. Sok, D. HIV Broadly Neutralizing Antibodies: Taking Good Care Of The 98 / D. Sok, D. R. Burton // *Immunity.* – 2016. – Vol. 45, № 5. – P. 958–960.
48. Recombinant anti-P protein autoantibodies isolated from a human autoimmune library: reactivity, specificity and epitope recognition / S. Zampieri [et al.] // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2003. – Vol. 60, № 3. – P. 588–598.
49. Hoogenboom, H. R. By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro / H. R. Hoogenboom, G. Winter // *J. Mol. Biol.* – 1992. – Vol. 227, № 2. – P. 381–388.
50. Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides / A. Knappik [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 296, № 1. – P. 57–86.
51. A fully synthetic human Fab antibody library based on fixed VH/VL framework pairings with favorable biophysical properties / T. Tiller [et al.] // *MAbs.* – 2013. – Vol. 5, № 3. – P. 445–470.
52. The human combinatorial antibody library HuCAL GOLD combines diversification of all six CDRs according to the natural immune system with a novel display method for efficient selection of high-affinity antibodies / C. Rothe [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 376, № 4. – P. 1182–1200.
53. Construction of a Semisynthetic Human VH Single-Domain Antibody Library and Selection of Domain Antibodies against alpha-Crystalline of Mycobacterium tuberculosis / N. H. Hairul Bahara [et al.] // *J Biomol Screen.* – 2016. – Vol. 21, № 1. – P. 35–43.
54. Eteshola, E. Isolation of scFv fragments specific for monokine induced by interferon-gamma (MIG) using phage display / E. Eteshola // *J. Immunol. Methods.* – 2010. – Vol. 358, № 1–2. – P. 104–10.
55. Development of a novel human scFv against EGFR L2 domain by phage display technology / L. Rahbarnia [et al.] // *Curr. Pharm. Des.* – 2016. – Vol. № – P.
56. Human combinatorial Fab library yielding specific and functional antibodies against the human fibroblast growth factor receptor 3 / R. Rauchenberger [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, № 40. – P. 38194–38205.
57. Padlan, E. A. Anatomy of the antibody molecule / E. A. Padlan // *Mol Immunol.* – 1994. – Vol. 31, № 3. – P. 169–217.
58. Padlan, E. A. Does base composition help predispose the complementarity-determining regions of antibodies to hypermutation? / E. A. Padlan // *Mol. Immunol.* – 1997. – Vol. 34, № 11. – P. 765–770.
59. Tyrosine plays a dominant functional role in the paratope of a synthetic antibody derived from a four amino acid code / F. A. Fellouse [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2006. – Vol. 357, № 1. – P. 100–114.
60. Ho, S. Y. Electroporation of cell membranes: a review / S. Y. Ho, G. S. Mittal // *Crit. Rev. Biotechnol.* – 1996. – Vol. 16, № 4. – P. 349–362.
61. Phage display antibodies for diagnostic applications / N. H. Hairul Bahara [et al.] // *Biologicals.* – 2013. – Vol. 41, № 4. – P. 209–216.
62. Igawa, T. pH-dependent antigen-binding antibodies as a novel therapeutic modality / T. Igawa, F. Mimoto, K. Hattori // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – Vol. 1844, № 11. – P. 1943–1950.
63. De novo isolation of antibodies with pH-dependent binding properties / P. Bonvin [et al.] // *MAbs.* – 2015. – Vol. 7, № 2. – P. 294–302.
64. The multiple roles of histidine in protein interactions / S. M. Liao [et al.] // *Chem Cent J.* – 2013. – Vol. 7, № 1. – P. 44.
65. Allosteric control of ligand-binding affinity using engineered conformation-specific effector proteins / S. S. Rizk [et al.] // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 18, № 4. – P. 437–442.
66. Crystal structure of full-length KcsA in its closed conformation / S. Uysal [et al.] // *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A.* – 2009. – Vol. 106, № 16. – P. 6644–6649.
67. Rainey, W. E. Adrenal zonation: clues from 11beta-hydroxylase and aldosterone synthase / W. E. Rainey // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 1999. – Vol. 151, № 1–2. – P. 151–60.
68. Structural insights into aldosterone synthase substrate specificity and targeted inhibition / N. Strushkevich [et al.] // *Mol. Endocrinol.* – 2013. – Vol. 27, № 2. – P. 315–324.
69. Development of monoclonal antibodies against human CYP11B1 and CYP11B2 / C. E. Gomez-Sanchez [et al.] // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2014. – Vol. 383, № 1–2. – P. 111–117.
70. Application of Bio-Layer Interferometry for the analysis of protein/liposome interactions / Wallner, J. [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2013. – Vol. 72, № – P. 150–154.
71. HuCAL PLATINUM, a synthetic Fab library optimized for sequence diversity and superior performance in mammalian expression systems / J. Prassler [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 413, № 1. – P. 261–278.
72. Frenzel, A. Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy / A. Frenzel, T. Schirrmann, M. Hust // *MAbs.* – 2016. – Vol. 8, № 7. – P. 1177–1194.

## References

1. Burden R. E., Caswell J., Fay F., Scott C. J., “Recent advances in the application of antibodies as therapeutics”, *Future Medicinal Chemistry*, 2012, vol. 4, no. 1, pp. 73–86.
2. Borrebaeck C. A., “Antibodies in diagnostics - from immunoassays to protein chips”, *Immunology Today*, 2000, vol. 21, no. 8, pp. 379–382.

3. Rodgers K. R., Chou R. C., “Therapeutic monoclonal antibodies and derivatives: Historical perspectives and future directions”, *Biotechnology Advances*, 2016, vol. 34, no. 6, pp. 1149–1158.
4. Ecker D. M., Jones S. D., Levine H. L., “The therapeutic monoclonal antibody market”, *MAbs*, 2015, vol. 7, no. 1, pp. 9–14.
5. Asplund A., Edqvist P. H., Schwenk J. M., Ponten F., “Antibodies for profiling the human proteome-The Human Protein Atlas as a resource for cancer research”, *Proteomics*, 2012, vol. 12, no. 13, pp. 2067–2077.
6. Uhlen M., Oksvold P., Fagerberg L., Lundberg E., Jonasson K., Forsberg M., Zwahlen M., Kampf C., Wester K., Hober S., Wernerus H., Bjorling L., Ponten F., “Towards a knowledge-based Human Protein Atlas”, *Nature Biotechnology*, 2010, vol. 28, no. 12, pp. 1248–1250.
7. Buchner J., Rudolph R., “Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in *Escherichia coli*”, *Biotechnology (N Y)*, 1991, vol. 9, no. 2, pp. 157–162.
8. Rousseaux, J., Rousseaux-Prevost R., Bazin H., “Optimal conditions for the preparation of Fab and F(ab')<sub>2</sub> fragments from monoclonal IgG of different rat IgG subclasses”, *Journal of Immunological Methods*, 1983, vol. 64, no. 1–2, pp. 141–146.
9. Gaudreault J., Fei D., Rusit J., Suboc P., Shiu V., “Preclinical pharmacokinetics of Ranibizumab (rhuFabV2) after a single intravitreal administration”, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2005, vol. 46, no. 2, pp. 726–733.
10. Bird R. E., Hardman K. D., Jacobson J. W., Johnson S., Kaufman B. M., Lee S. M., Lee T., Pope S. H., Riordan G. S., Whitlow M., “Single-chain antigen-binding proteins”, *Science*, 1988, vol. 242, no. 4877, pp. 423–426.
11. Sokolova E. A., Stremovskiy O. A., Zdobnova T. A., Balalaeva I. V., Deyev S. M., “Recombinant Immunotoxin 4D5scFv-PE40 for Targeted Therapy of HER2-Positive Tumors”, *Acta Naturae*, 2015, vol. 7, no. 4, pp. 93–96.
12. Albertini M. R., Hank J. A., Schiller J. H., Khorsand M., Borchert A. A., Gan J., Bechhofer R., Storer B., Reisfeld R. A., Sondel P. M., “Phase IB trial of chimeric antidisialoganglioside antibody plus interleukin 2 for melanoma patients”, *Clinical Cancer Research*, 1997, vol. 3, no. 8, pp. 1277–1288.
13. Vial T., Descotes J., “Immune-mediated side-effects of cytokines in humans”, *Toxicology*, 1995, vol. 105, no. 1, pp. 31–57.
14. Heuser C., Ganser M., Hombach A., Brand H., Denton G., Hanisch F. G., Abken H., “An anti-MUC1-antibody-interleukin-2 fusion protein that activates resting NK cells to lysis of MUC1-positive tumour cells”, *British Journal of Cancer*, 2003, vol. 89, no. 6, pp. 1130–1139.
15. Penichet M. L., Harvill E. T., Morrison S. L., “An IgG3-IL-2 fusion protein recognizing a murine B cell lymphoma exhibits effective tumor imaging and antitumor activity”, *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 1998, vol. 18, no. 8, pp. 597–607.
16. Clementschitsch F., Bayer K., “Improvement of bioprocess monitoring: development of novel concepts”, *Microbial Cell Factories*, 2006, no. 5, p. 19.
17. Dormeshkin D., Gilep A., Sergeev G., Usanov S., “Development of CYB5-fusion monitoring system for efficient periplasmic expression of multimeric proteins in *Escherichia coli*”, *Protein expression and purification*, 2016, vol. 128, pp. 60–66.
18. Spinelli S., Frenken L., Bourgeois D., de Ron L., Bos W., Verrips T., Anguille C., Cambillau C., Tegoni M., “The crystal structure of a llama heavy chain variable domain”, *Nature Structural Biology*, 1996, vol. 3, no. 9, pp. 752–757.
19. Zielonka S., Empting M., Grzeschik J., Konning D., Barelle C. J., Kolmar H., “Structural insights and biomedical potential of IgNAR scaffolds from sharks”, *MAbs*, 2015, vol. 7, no. 1, pp. 15–25.
20. Rouet R., Dudgeon K., Christ D., “Generation of human single domain antibody repertoires by Kunkel mutagenesis”, *Methods in Molecular Biology*, 2012, vol. 907, pp. 195–209.
21. De Vos J., Devoogdt N., Lahoutte T., Muyldermans S., “Camelid single-domain antibody-fragment engineering for (pre)clinical in vivo molecular imaging applications: adjusting the bullet to its target”, *Expert opinion on biological therapy*, 2013, vol. 13, no. 8, pp. 1149–1160.
22. Van Roy M., Ververken C., Beirnaert E., Hoefman S., Kolkman J., Vierboom M., Breedveld E., t Hart B., Poelmans S., Bontinck L., Hemeryck A., Jacobs S., Baumeister J., Ulrichs H., “The preclinical pharmacology of the high affinity anti-IL-6R Nanobody(R) ALX-0061 supports its clinical development in rheumatoid arthritis”, *Arthritis research & therapy*, 2015, vol. 17, p. 135.
23. Holz J. B., “The TITAN trial--assessing the efficacy and safety of an anti-von Willebrand factor Nanobody in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura”, *Transfusion and apheresis science*, 2012, vol. 46, no. 3, pp. 343–346.
24. Detalle L., Stohr T., Palomo C., Piedra P.A., Gilbert B.E., Mas V., Millar A., Power U.F., Stortelers C., Allosery K., Melero J.A., Depla E., “Generation and Characterization of ALX-0171, a Potent Novel Therapeutic Nanobody for the Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015, vol. 60, no. 1, pp. 6–13.
25. Rousserie G., Grinevich R., Brazhnik K., Even-Desrumaux K., Reveil B., Tabary T., Chames P., Baty D., Cohen J. H., Nabiev I., Sukhanova A., “Detection of carcinoembryonic antigen using single-domain or full-size antibodies stained with quantum dot conjugates”, *Analytical Biochemistry*, 2015, vol. 478, pp. 26–32.
26. Schroeder K. L., Goreham R. V., Nann T., “Graphene Quantum Dots for Theranostics and Bioimaging”, *Pharmaceutical Research*, 2016, vol. 33, no. 10, pp. 2337–2357.
27. Ferrer M., Maiolo J., Kratz P., Jackowski J. L., Murphy D. J., Delagrave S., Inglese J., “Directed evolution of PDZ variants to generate high-affinity detection reagents”, *Protein Engineering Design and Selection*, 2005, vol. 18, no. 4, pp. 165–173.
28. Hosse R. J., Rothe A., Power B. E., “A new generation of protein display scaffolds for molecular recognition”, *Protein Science*, 2006, vol. 15, no. 1, pp. 14–27.
29. Sedgwick S. G., Smerdon S. J., “The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework”, *Trends in biochemical sciences*, 1999, vol. 24, no. 8, pp. 311–316.
30. Friedman M., Orlova A., Johansson E., Eriksson T. L., Hoiden-Guthenberg I., Tolmachev V., Nilsson F. Y., Stahl S., “Directed evolution to low nanomolar affinity of a tumor-targeting epidermal growth factor receptor-binding antibody molecule”, *Journal of Molecular Biology*, 2008, vol. 376, no. 5, pp. 1388–1402.



31. Kohler G., Milstein C., “Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity”, *Nature*, 1975, vol. 256, no. 5517, pp. 495–497.
32. Ruberti F., Bradbury A., Cattaneo A., “Cloning and expression of an anti-nerve growth factor (NGF) antibody for studies using the neuroantibody approach”, *Cellular and Molecular Neurobiology*, 1993, vol. 13, no. 5, pp. 559–568.
33. Nicholls P. J., Johnson V. G., Blanford M. D., Andrew S. M., “An improved method for generating single-chain antibodies from hybridomas”, *Journal of Immunological Methods*, 1993, vol. 165, no. 1, pp. 81–91.
34. Luo L., Luo Q., Guo L., Lv M., Lin Z., Geng J., Li X., Li Y., Shen B., Qiao C., Feng J., “Structure-based affinity maturation of a chimeric anti-ricin antibody C4C13”, *Journal Of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2014, vol. 32, no. 3, pp. 416–423.
35. Ikonomova S. P., He Z., Karlsson A. J., “A simple and robust approach to immobilization of antibody fragments”, *Journal of Immunological Methods*, 2016, vol. 435, pp. 7–16.
36. Toleikis L., Frenzel A., “Cloning single-chain antibody fragments (ScFv) from hybridoma cells”, *Methods in Molecular Biology*, 2012, vol. 907, pp. 59–71.
37. Dormeshkin D. O., Svirid A. V., Gilep A. A., Sciridov O. V., Usanov S. A., “Generation and characterization of biotinylated recombinant Fab antibody fragment against cortisol”, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2016, vol. 42, no. 1, p. 7.
38. Tomita M., Tsumoto K., “Hybridoma technologies for antibody production”, *Immunotherapy*, 2011, vol. 3, no. 3, pp. 371–380.
39. Smith G. P., “Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface”, *Science*, 1985, vol. 228, no. 4705, pp. 1315–1317.
40. Bradbury A. R., Sidhu S., Dubel S., McCafferty J., “Beyond natural antibodies: the power of in vitro display technologies”, *Nature Biotechnology*, 2011, vol. 29, no. 3, pp. 245–254.
41. Schofield D. J., Pope A. R., Clementel V., Buckell J., Chapple S., Clarke K. F., Conquer J. S., Crofts A. M., Crowther S. R., Dyson M. R., Flack G., Griffin G. J., Hooks Y., Howat W. J., Kolb-Kokocinski A., Kunze S., Martin C. D., Maslen G. L., Mitchell J. N., O’Sullivan M., Perera R. L., Roake W., Shadbolt S. P., Vincent K. J., Warford A., Wilson W. E., Xie J., Young J. L., McCafferty J., “Application of phage display to high throughput antibody generation and characterization”, *Genome Biology*, 2007, vol. 8, no. 11, p. R254.
42. Carmen S., Jermutus L., “Concepts in antibody phage display”, *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 2002, vol. 1, no. 2, pp. 189–203.
43. Jez J., Antes B., Castilho A., Kainer M., Wiederkum S., Grass J., Ruker F., “Woissetschlager M., Steinkellner H. Significant impact of single N-glycan residues on the biological activity of Fc-based antibody-like fragments”, *Journal of Biological Chemistry*, 2012, vol. 287, no. 29, pp. 24313–24319.
44. Watkins N. A., Ouweland W. H., “Introduction to antibody engineering and phage display”, *Vox Sanguinis*, 2000, vol. 78, no. 2, pp. 72–79.
45. Griffiths A. D., Duncan A. R., “Strategies for selection of antibodies by phage display”, *Current opinion in biotechnology*, 1998, vol. 9, no. 1, pp. 102–108.
46. Clackson T., Hoogenboom H. R., Griffiths A. D., Winter G., “Making antibody fragments using phage display libraries”, *Nature*, 1991, vol. 352, no. 6336, pp. 624–628.
47. Sok D., Burton D. R., “HIV Broadly Neutralizing Antibodies: Taking Good Care Of The 98”, *Immunity*, 2016, vol. 45, no. 5, pp. 958–960.
48. Zampieri S., Mahler M., Bluthner M., Qiu Z., Malmegrim K., Ghirardello A., Doria A., van Venrooij W. J., Raats J. M., “Recombinant anti-P protein autoantibodies isolated from a human autoimmune library: reactivity, specificity and epitope recognition”, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2003, vol. 60, no. 3, pp. 588–598.
49. Hoogenboom H. R., Winter G., “By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro”, *Journal of Molecular Biology*, 1992, vol. 227, no. 2, pp. 381–388.
50. Knappik A., Ge L., Honegger A., Pack P., Fischer M., Wellnhöfer G., Hoess A., Wolle J., Pluckthun A., Virnekas B., “Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides”, *Journal of Molecular Biology*, 2000, vol. 296, no. 1, pp. 57–86.
51. Tiller T., Schuster I., Deppe D., Siegers K., Strohnner R., Herrmann T., Berenguer M., Poujol D., Stehle J., Stark Y., Hessling M., Daubert D., Felderer K., Kaden S., Kolln J., Enzelberger M., Urlinger S., “A fully synthetic human Fab antibody library based on fixed VH/VL framework pairings with favorable biophysical properties”, *MAbs*, 2013, vol. 5, no. 3, pp. 445–470.
52. Rothe C., Urlinger S., Lohning C., Prassler J., Stark Y., Jager U., Hubner B., Bardroff M., Pradel I., Boss M., Bittlingmaier R., Bataa T., Frisch C., Brocks B., Honegger A., Urban M., “The human combinatorial antibody library HuCAL GOLD combines diversification of all six CDRs according to the natural immune system with a novel display method for efficient selection of high-affinity antibodies”, *Journal of Molecular Biology*, 2008, vol. 376, no. 4, pp. 1182–1200.
53. Hairul Bahara N. H., Chin S. T., Choong Y. S., Lim T. S., “Construction of a Semisynthetic Human VH Single-Domain Antibody Library and Selection of Domain Antibodies against alpha-Crystalline of Mycobacterium tuberculosis”, *Journal of Biomolecular Screening*, 2016, vol. 21, no. 1, pp. 35–43.
54. Eteshola E., “Isolation of scFv fragments specific for monokine induced by interferon-gamma (MIG) using phage display”, *Journal of Immunological Methods*, 2010, vol. 358, no. 1–2, pp. 104–110.
55. Rahbarnia L., Farajnia S., Babaei H., Majidi J., Veisi K., Khosroshahi S. A., Tanomand A., “Development of a novel human scFv against EGFR L2 domain by phage display technology”, *Current Pharmaceutical Design*, 2016, vol. 22, setp. 28.
56. Rauchenberger R., Borges E., Thomassen-Wolf E., Rom E., Adar R., Yaniv Y., Malka M., Chumakov I., Kotzer S., Resnitzky D., Knappik A., Reiffert S., Prassler J., Jury K., Waldherr D., Bauer S., Kretzschmar T., Yayon A., Rothe C., “Human combinatorial Fab library yielding specific and functional antibodies against the human fibroblast growth factor receptor 3”, *Journal of Biological Chemistry*, 2003, vol. 278, no. 40, pp. 38194–38205.
57. Padlan E. A., “Anatomy of the antibody molecule”, *Molecular Immunology*, 1994, vol. 31, no. 3, pp. 169–217.

58. Padlan E. A., “Does base composition help predispose the complementarity-determining regions of antibodies to hypermutation?”, *Molecular Immunology*, 1997, vol. 34, no. 11, pp. 765–770.
59. Fellouse F. A., Barthelemy P. A., Kelley R. F., Sidhu S. S., “Tyrosine plays a dominant functional role in the paratope of a synthetic antibody derived from a four amino acid code”, *Journal of Molecular Biology*, 2006, vol. 357, no. 1, pp. 100–114.
60. Ho S. Y., Mittal G. S., “Electroporation of cell membranes: a review”, *Critical Reviews In Biotechnology*, 1996, vol. 16, no. 4, pp. 349–362.
61. Hairul Bahara N. H., Tye G. J., Choong Y. S., Ong E. B., Ismail A., Lim T. S., “Phage display antibodies for diagnostic applications”, *Biologicals*, 2013, vol. 41, no. 4, pp. 209–216.
62. Igawa T., Mimoto F., Hattori K., “pH-dependent antigen-binding antibodies as a novel therapeutic modality”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, vol. 1844, no. 11, pp. 1943–1950.
63. Bonvin P., Venet S., Fontaine G., Ravn U., Gueneau F., Kosco-Vilbois M., Proudfoot A. E., Fischer N., “De novo isolation of antibodies with pH-dependent binding properties”, *MAbs*, 2015, vol. 7, no. 2, pp. 294–302.
64. Liao S. M., Du Q. S., Meng J. Z., Pang Z. W., Huang R. B., “The multiple roles of histidine in protein interactions”, *Chemistry Central Journal*, 2013, vol. 7, no. 1, p. 44.
65. Rizk S. S., Paduch M., Heithaus J. H., Duguid E. M., Sandstrom A., Kossiakov A. A., “Allosteric control of ligand-binding affinity using engineered conformation-specific effector proteins”, *Nature Structural & Molecular Biology*, 2011, vol. 18, no. 4, pp. 437–442.
66. Uysal S., Vasquez V., Tereshko V., Esaki K., Fellouse F. A., Sidhu S. S., Koide S., Perozo E., Kossiakov A., “Crystal structure of full-length KcsA in its closed conformation”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, vol. 106, no. 16, pp. 6644–6649.
67. Rainey W. E., “Adrenal zonation: clues from 11 $\beta$ -hydroxylase and aldosterone synthase”, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1999, vol. 151, no. 1–2, pp. 151–160.
68. Strushkevich N., Gilep A. A., Shen L., Arrowsmith C. H., Edwards A. M., Usanov S. A., Park H. W., “Structural insights into aldosterone synthase substrate specificity and targeted inhibition”, *Molecular Endocrinology*, 2013, vol. 27, no. 2, pp. 315–324.
69. Gomez-Sanchez C. E., Qi X., Velarde-Miranda C., Plonczynski M. W., Parker C. R., Rainey W., Satoh F., Maekawa T., Nakamura Y., Sasano H., Gomez-Sanchez E. P., “Development of monoclonal antibodies against human CYP11B1 and CYP11B2”, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2014, vol. 383, no. 1–2, pp. 111–117.
70. Wallner J., Lhota G., Jeschek D., Mader A., Vorauer-Uhl K., “Application of Bio-Layer Interferometry for the analysis of protein/liposome interactions”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2013, vol. 72, pp. 150–154.
71. Prassler J., Thiel S., Pracht C., Polzer A., Peters S., Bauer M., Norenberg S., Stark Y., Kolln J., Popp A., Urlinger S., Enzelberger M., “HuCAL PLATINUM, a synthetic Fab library optimized for sequence diversity and superior performance in mammalian expression systems”, *Journal of Molecular Biology*, 2011, vol. 413, no. 1, pp. 261–278.
72. Frenzel A., Schirrmann T., Hust M., “Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy”, *Mabs*, 2016, vol. 8, no. 7, pp. 1177–1194.

### Информация об авторах

*Дормешкин Дмитрий Олегович* – науч. сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: dormeshkin@gmail.com.

*Бричко Екатерина Андреевна* – студент, Белорусский государственный университет (просп. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kate.bri13@gmail.com.

*Гилеп Андрей Александрович* – канд. хим. наук, зав. отделом молекулярных биотехнологий, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: agilep@iboch.bas-net.by.

*Усанов Сергей Александрович* – член-кор., д-р хим. наук, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: usanov@iboch.bas-net.by.

### Для цитирования

Фаговый дисплей в конструировании антител с заданными свойствами / Д.О. Дормешкин [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 2. – С. 93–110.

### Information about the authors

*Dormeshkin Dmitri Olegovich* – Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2 Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dormeshkin@gmail.com.

*Brichko Ekaterina Andreevna* – Student, Belarusian State University (4 Nezavisimosti Ave., 220141, Minsk, Republic of Belarus). Email: kate.bri13@gmail.com.

*Gilep Andrei Aleksandrovich* – Ph.D. (Chemistry), Head of the Department of molecular biotechnologies, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2 Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: agilep@iboch.bas-net.by.

*Usanov Sergei Aleksandrovich* – Corr. Member of the National Academy of Sciences, D. Sc. (Chemistry), Professor, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2 Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: usanov@iboch.bas-net.by.

### For citation

Dormeshkin D. O., Brichko E. A., Gilep A. A., Usanov S. A. Phage display in engineering of antibodies with desired properties. *Vestsi Natsyyanal'nei akademiі navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk*. [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 2, pp. 93–110. (In Russian).