

ПОСЛЕДНИЕ РАЗРАБОТКИ В ОБЛАСТИ БИОТЕХНОЛОГИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФРАГМЕНТОВ АНТИТЕЛ

Обзор

© 2023 N. Zelenovic¹, L. Filipovic², M. Popovic^{3*}

¹ Center for Chemistry, Institute for Chemistry, Technology and Metallurgy,
National Institute of Republic of Serbia, University of Belgrade, 11000 Belgrade, Serbia

² Innovative Centre, Faculty of Chemistry, University of Belgrade, 11000 Belgrade, Serbia

³ Department of Biochemistry, Faculty of Chemistry, University of Belgrade,
11000 Belgrade, Serbia; e-mail: la_bioquimica@chem.bg.ac.rs

Поступила в редакцию 13.05.2023

После доработки 12.07.2023

Принята к публикации 18.08.2023

Применение антител в биотехнологии и биомедицине неуклонно растёт с 1980-х гг. Будучи уникальными и высокоспецифичными биореагентами, моноклональные антитела (monoclonal antibodies, mAb) широко используются и одобрены в качестве терапевтических агентов. Однако использование mAb в терапевтических целях имеет определённые ограничения. Фрагменты антител (antibody fragments, AbF) с сохранёнными антигенсвязывающими сайтами потенциально способны преодолеть недостатки обычных mAb, такие как гетерогенное распределение в тканях после системного применения, особенно в случае солидных опухолей, а также Fc-опосредованная активация иммунной системы в присутствии свидетеля. AbF имеют лучший коэффициент биораспределения благодаря более низкой молекулярной массе. Они сохраняют функциональные особенности mAb, такие как специфичность к антигену и возможность его связывать, при этом гораздо лучше проникая в ткани. Дополнительным преимуществом AbF является возможность их производства в бактериальных и дрожжевых клетках благодаря небольшому размеру, более прочной структуре и отсутствию посттрансляционных модификаций. В данном обзоре описываются разные подходы к получению AbF, приводятся недавние примеры их синтеза в бактериальных и дрожжевых системах экспрессии и методы оптимизации их получения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фрагменты антител, бактериальная экспрессия, дрожжевая экспрессия, scFv, VHH.

DOI: 10.31857/S0320972523090014, **EDN:** WSLAON

ВВЕДЕНИЕ

Применение антител стало неотъемлемой частью диагностики, медицинской визуализации и терапии. В частности, они регулярно используются в различных клинических анализах, включая иммуноблоттинг, проточную цитометрию и иммуногистохимию [1], например, для обнаружения антигенов или токсинов. Антитела можно получить в моноклональной форме, что делает возможным их широкое применение в лечении рака и воспалительных заболеваний. Однако продукция моноклональных

антител (monoclonal antibodies, mAb) с использованием классической гибридомной технологии имеет ограничения, поскольку гибридомы обычно имеют слабую секрецию и генетически нестабильны [2]. Таким образом, на получение достаточного количества mAb требуется в среднем от 6 до 8 месяцев. Мышиные mAb иммуногенны и малоэффективны из-за ксеногенной структуры Fc, поэтому для их терапевтического применения требуется дальнейшая гуманизация, что повышает цену изготовления [1].

Разработка методов производства рекомбинантных mAb в 1980-х гг. дала возможность

Принятые сокращения: AbF – antibody fragment, фрагмент антитела; mAb – monoclonal antibody, моноклональное антитело; scFv – single-chain variable fragments, одноцепочечные переменные фрагменты; VHH – variable domains of heavy-chain antibody, переменные домены антител из тяжёлых цепей.

* Адресат для корреспонденции.

производить антитела в большом масштабе для использования в доклинических и клинических испытаниях. Несмотря на очевидные преимущества, mAb также имеют некоторые недостатки, такие как высокая стоимость и временные ограничения, связанные с их производством. Большая молекулярная масса и гетеротетрамерная структура как классических, так и гуманизированных mAb делают их неподходящими для некоторых применений *in vivo*. В качестве альтернативы были созданы различные типы фрагментов антител (antibody fragments, AbF). Самые распространённые из них — одноцепочечные переменные фрагменты (single-chain variable fragments, scFv), однодоменные антитела или переменные домены антител из тяжёлых цепей (variable domains of heavy-chain antibodies, VHH), а также переменные фрагменты нового антиген-рецептора иммуноглобулина (variable fragments of immunoglobulin new antigen receptor, VNAR) [3]. Благодаря техникам фагового и дрожжевого дисплея, которые существенно ускорили выявление антител к различным антигенам и дали возможность оптимизировать структуру антител для улучшения их связывающих свойств, стал возможным скрининг больших библиотек

AbF. Методы дисплея, особенно фагового, являются важной движущей силой для открытия антител, которые в дальнейшем можно модифицировать, оптимизировать и синтезировать [4].

AbF можно получить с помощью протеолиза или генной инженерии (рис. 1). Самыми хорошо изученными типами AbF являются участки связывания антигена (fragment antigen-binding regions, Fab), scFv и VHH. Fab можно получить с помощью ферментного расщепления IgG папаином или пепсином, дающего по два Fab- или F(ab')₂-фрагмента соответственно. Прорыв в производстве рекомбинантных антител произошёл с получением scFv путём соединения переменных доменов тяжёлых и средних цепей (VH и VL соответственно) пептидным линкером с формированием единой полипептидной цепи. AbF такого типа сохраняют антигенсвязывающие свойства mAb, но могут экспрессироваться в *E. coli* [5]. VHH, полученные из антител, состоящих только из тяжёлых цепей (встречающихся в природе у верблюдовых), стабильны и могут связываться с антигеном, несмотря на отсутствие лёгкой цепи. Структура и функции VHH сходны с таковыми для VH-доменов обычных антител, за исключением ключевых мутаций в каркасном

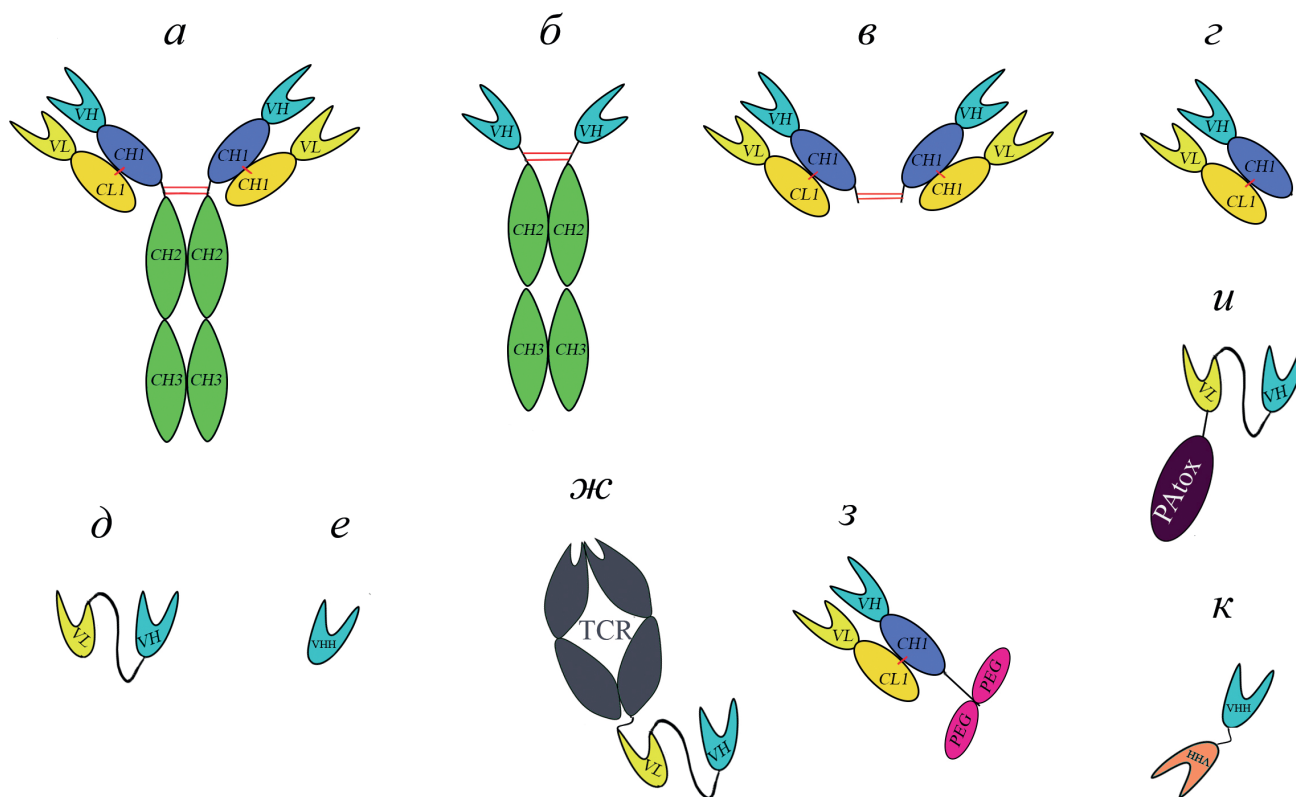


Рис. 1. Структура антител различных форматов. *a* — Обычные mAb; *б* — антитела только из тяжёлых цепей; *в* — фрагмент F(ab')₂, *г* — фрагмент Fab, *д* — scFv; *е* — VHH; *ж* — биспецифичный слитный белок рецептор Т-клеток (TCR)—scFv; *з* — пегилированный Fab; *и* — слитный белок scFv—усечённый экзотоксин А *Pseudomonas*; *к* — тандемные VHH. Красные линии показывают межцепочечные дисульфидные мостики, внутрицепочечные дисульфидные мостики не показаны

участке 2, отвечающем за взаимодействие между вариабельными доменами в обычных иммуноглобулинах. Благодаря своей повышенной структурной стабильности и пониженной склонности к агрегации VHH предпочтительны в условиях, требующих высокостабильных антител (повышенная концентрация детергента, низкий pH), и могут использоваться для визуализации и лечения онкологических, инфекционных, воспалительных и нейродегенеративных заболеваний [3]. Несмотря на более короткий период полувыведения из кровообращения путём фильтрации в почках, AbF обладают рядом уникальных преимуществ перед классическими mAbs, в частности, улучшенным проникновением в ткани, особенно солидные опухоли [6], более высоким соотношением опухоль/орган [7] и способностью эффективно проникать через биологические (например, эпителиальные и эндотелиальные) барьеры [8].

scFv и VHH становятся биотерапевтическими агентами, поскольку их малый размер обеспечивает лучшее проникновение в ткани [9]. Для эффективной оценки концентрации белков в плазме на основании их фармакокинетики можно использовать коэффициент биораспределения (biodistribution coefficient, BC – отношение концентраций mAb в ткани и плазме). Соотношение между BC и размером белка дало возможность вывести значения BC₅₀ для всех тканей. Большая молекулярная масса приведёт к уменьшению величины 50%-ного поглощения белка тканью. Для большинства тканей значение BC₅₀ составило ~35 кДа, указывая на то, что распределение AbF в ткани может происходить более эффективно по сравнению с mAb [10]. Меньший размер AbF и лучшие значения BC₅₀ могут помочь в подборе дозировки и введении AbF, особенно в случае несистемного применения [11]. AbF обладают высокими значениями BC₅₀ для почек, показывая, что они с высокой вероятностью будут фильтроваться и реабсорбироваться из мочи [10, 12]. За последние годы рекомбинантные AbF стали одними из самых широко используемых биофармацевтических продуктов для терапевтического применения, а также для иммунодетекции, очистки и биосепарации [3]. Причиной популярности AbF в биотехнологии является возможность их биосинтеза в бактериальных и/или дрожжевых клетках и, следовательно, более низкие затраты на производство каждого миллиграмма белка. Данный обзор сосредоточен на последних достижениях в области продукции AbF в прокариотических и эукариотических системах экспрессии, таких как *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*.

ПРОДУКЦИЯ AbF В КЛЕТКАХ *E. coli*

E. coli как клетка-хозяин экспрессии AbF.

Прокариотические системы экспрессии широко используются для биосинтеза различных типов рекомбинантных белков, в том числе аллергенов, ферментов и AbF [13–15]. Чаше всего в качестве бактериальной клетки-хозяина используется *E. coli*, которая из модельного организма для исследований превратилась в продуцент гетерологичных белков в промышленных масштабах. Около 30% биофармацевтических препаратов всего мира синтезируются именно в *E. coli*, которая всё ещё используется как золотой стандарт синтеза рекомбинантных белков [9, 14]. Этот организм хорошо изучен и тщательно охарактеризован, его можно легко контролировать различными молекулярными инструментами. *E. coli*, как клетка-хозяин экспрессии рекомбинантных AbF, имеет преимущества перед другими системами экспрессии, включая быстрый рост, минимальную сложность среды, низкую стоимость производства и лёгкость его масштабирования. Она остаётся оптимальным вариантом для масштабного и недорогого производства негликозилированных рекомбинантных белков. Поскольку AbF не гликозилированы, их можно синтезировать в клетках *E. coli* без потери функциональных свойств [16]. Несколько лекарств, основанных на AbF и одобренных FDA и EMA, были успешно синтезированы в *E. coli* (табл. 1). AbF можно синтезировать в различных клеточных компартментах, например, в периплазме (ранибизумаб и цертолизумаб пегол) и внеклеточном пространстве (каплализумаб и опортумаб), или же производить в составе телец включения с последующим рефолдингом (тебентафусп и бролулизумаб) [9, 17].

Разработано множество стратегий получения высокого выхода рекомбинантных AbF. При использовании в качестве продуцента *E. coli* следует учесть три главных аспекта продукции AbF: штаммы, векторы и условия культивирования.

Традиционные подходы к синтезу AbF в клетках *E. coli*. AbF могут быть успешно получены в цитоплазме и периплазме, хотя у каждого из этих вариантов есть свои ограничения [19]. Например, если достигнуть высокого уровня синтеза AbF в цитоплазме, белки могут неправильно свернуться и сформировать нерастворимые тельца включения. Секретция в периплазму делает возможным формирование естественных дисульфидных связей, но периплазматическое пространство ограничено, что приводит к меньшему выходу или формированию агрегатов.

Таблица 1. Одобренные FDA и EMA терапевтические AbFs, синтезированные в клетках *E. coli* [18]

Название	Терапевтическое применение	Формат AbF	Год одобрения (FDA или EMA)
Блинатумомаб	острый лимфобластный лейкоз	мышинный биспецифический тандемный scFv	2014
Моксетумомаб пасудотокс	волосатоклеточный лейкоз	стабилизированный дисульфидом слитный белок Fv (dsFv)-PE38–фрагмент экзотоксина A <i>Pseudomonas</i>	2018
Каплацизумаб	приобретённая тромбоцитопеническая пурпура	гуманизированное нанотело	2019
Бролуцизумаб	неоваскулярная возрастная макулярная дегенерация	гуманизированный scFv	2019
Тебентафусп	неоперабельная или метастатическая увеальная меланома	биспецифичный слитный белок TCR–scFv	2022
Ранибизумаб	возрастная макулярная дегенерация, диабетическая ретинопатия, макулярный отёк	Fab	2006
Цертолизумаб пегол	активный псориатический артрит	пегилированный Fab	2008
Опортузумаб монатокс	рак мочевого пузыря	гуманизированный слитный белок scFv–усечённый экзотоксин A <i>Pseudomonas</i>	2021

Периплазма обеспечивает более прямой подход к очистке белков, поскольку её можно лизировать в очень мягких условиях. Внешняя мембрана может быть разрушена с помощью осмотического шока, механического воздействия или лёгкой термической обработки. Также периплазматическое пространство, в отличие от цитоплазмы, содержит лишь 4–8% от нативных белков *E. coli*, что упрощает процесс очистки [20].

Самой распространённой стратегией продукции AbF является экспрессия белков в растворимой форме в цитоплазме — она проста, обычно даёт высокий выход белка и не требует введения сигнальной последовательности в вектор [21]. Однако экспрессия белка в цитоплазме бактериальной клетки может приводить к некорректному формированию дисульфидных связей, что вызывает накопление рекомбинантных антител главным образом в виде телец включения. Тельца включения можно подвергнуть рефолдингу и формированию дисульфидных связей *in vitro*, после чего очистить для восстановления функциональной активности [22]. Рекомбинантные AbF также могут продуцироваться в цитозоле с использованием мутантных штаммов *E. coli*, сверхэкспрессирующих дисульфид-изомеразу для усиленного формирования дисульфидных связей [23, 24].

Чтобы обеспечить синтез рекомбинантных белков в растворимой форме, лучше стремиться к оптимальной, а не максимальной их про-

дукции. Некоторые группы исследователей показали, что активность дисульфид-изомеразы DsbC может увеличить выход функциональных AbF. Например, комбинирование этого подхода с коэкспрессией оксидоредуктаз оказалось лучшей стратегией синтеза белка в цитоплазме с высоким выходом (до 72 мг/л) [25, 26]. Слияние с другими белками (например, GFP) может улучшить растворимость целевого белка. Другие метки для слияния, такие как SNAP и SORT, могут привести к лучшей экспрессии, но также и усложнить процесс очистки [27].

Хотя AbF не гликозилированы, другие посттрансляционные модификации важны для их функциональной активности. Так, scFv содержат две дисульфидные связи, а Fab — пять или шесть. Производство AbF с естественными дисульфидными связями является сложным, особенно в больших масштабах. Примером успешного биосинтеза AbF с корректно сформированными дисульфидными связями в цитоплазме *E. coli* является использование системы CyDisCo, основанной на коэкспрессии фермента Ervlp, формирующего дисульфидные связи, и дисульфид-изомеразы белка (protein disulfide isomerase, PDI). Данную систему протестировали для экспрессии и очистки одиннадцати scFv и одиннадцати Fab, экспрессированных с одинаковых векторов при одинаковых условиях. Применение CyDisCo дало большое количество AbF, прошедших естественный фолдинг и обладающих биоло-

Таблица 2. Модификации штаммов *E. coli* [39]

Вид модификации	Название штамма	Характеристики/Применение
Отсутствие протеаз (Lon и OmpT)	BL21(DE3), BL21Star(DE3)	сниженная деградация чужеродного белка
Дополнение редкими тРНК	CodonPlus-RIL (BL21-RIL), CodonPlus-RP (BL21-RP), Rosetta	экспрессия редких кодонов (arg, ile, leu, pro)
Мутации в генах глутатионредуктазы (<i>gor</i>) и тиоредоксинредуктазы (<i>trxB</i>)	Origami, Shuffle T7, Rosetta-gami («Novagen»)	повышенное образование дисульфидных связей в цитозоле
Введение промотора (<i>araBAD</i>) или ингибитора промотора <i>T7</i> (лизоцим фага <i>T7</i>)	BL21-AI, pLys	экспрессия токсичных белков
Введение хорошо титруемого промотора рамнозы (<i>Prha</i>)	Lemo21(DE3)	экспрессия глобулярных или мембранных белков
Введение рестрицирующей метилцитозин-эндонуклеазы	McrA, McrBC, Mrr	сниженное метилирование
Коэкспрессия шаперона	штамм от «Agilent Technologies»	снижение неправильного фолдинга белка

гической активностью, что было показано на спектрах кругового дихроизма. Выход очищенных scFv и Fab-фрагментов составлял до 240 и 42 мг/л соответственно [28].

По сравнению с цитоплазмой (с восстанавливающей средой) периплазма лучше подходит для формирования дисульфидных связей в AbF, поскольку предоставляет для них более окисляющую среду. Кроме того, присутствие множества шаперонов и изомераз, таких как система Dsb, способствует правильному формированию дисульфидных связей. Большинство белков сначала продуцируется в цитоплазме и затем секретируется в периплазму различными путями (Sec, SRP и Tat). Для переноса в периплазму белкам требуется наличие на *N*-конце сигнального пептида (SpA, PhoA, PelB, OmpA, OmpT, DsbA, TorT или TolT), который вместе с молекулярными шаперонами и дисульфид-изомеразой (система Dsb) помогает белкам правильно сворачиваться и формировать дисульфидные связи. Для прямой секреции белков в периплазму можно использовать около 20 сигнальных пептидов [29]. Подобная таргетная периплазматическая секреция использовалась во многих случаях, например, для экспрессии PGT135 в количествах до ~1,2 г/л [8] или нескольких гуманизированных Fab' с выходом до 2,4 г/л [30].

Штаммы *E. coli*, использованные для синтеза AbF. В биотехнологии часто используется несколько штаммов (табл. 2), в частности, штаммы *E. coli* K-12 (MG1655, JM109, W3110, BW25113, DH5 α , DH1, WK6) и В (BL21, BL21(DE3), BL21(DE3) pLysS, BL21(DE3) Rosetta) [31]. Чаще используются штаммы К,

хотя они продуцируют большое количество ацетата, который может негативно влиять на синтез белка и рост клеток [32]. Штаммы В, полученные на основе штаммов К, напротив, производят меньше ацетата, что позволяет выращивать клетки при более высоких концентрациях глюкозы [33]. Таким образом, штаммы К лучше подходят для скрининга, в то время как штаммы В — для продукции белка для биофармацевтического применения [34].

ВНН обычно продуцируются в системе экспрессии *E. coli* WK6 [35], разработанной на основе штамма K12 и используемой для индуцируемой экспрессии генов ВНН. Клетки этих штаммов обладают высокой скоростью репликации и оказались наилучшим вариантом для корректного формирования дисульфидной связи. ВНН, экспрессируемые в периплазматическом пространстве, обычно модифицированы различными метками, что существенно снижает вероятность формирования телец включения [35, 36]. Клетки *E. coli* WK6 успешно использовались для высокопроизводительного синтеза ВНН против шиповидного белка вируса SARS-CoV-2 и пищевых аллергенов [37, 38].

ВЕКТОРЫ ДЛЯ СИНТЕЗА AbF

Выбор промотора важен для регуляции экспрессии и зависит от природы целевого белка [40–43]. Помимо промотора *T7*, используемого чаще всего, есть несколько других промоторов, обладающих определёнными преимуществами. Например, промотор *araBAD* является сильным, строго регулируемым

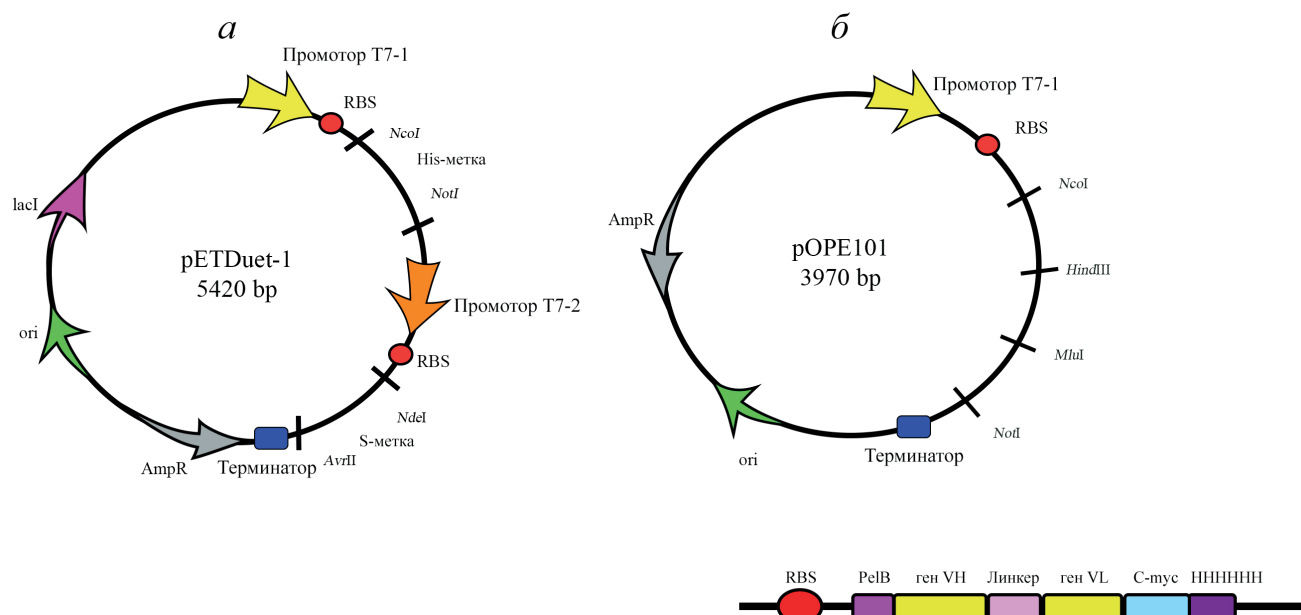


Рис. 2. Плазмиды pETDUET-1 (а) и pOPE101 (б), использованные для бактериальной экспрессии AbF

и хорошо титруемым, он используется главным образом для экспрессии токсичных белков. Ещё один промотор, *cspA* — это промотор холодового шока, дающий возможность экспрессировать белки при низких температурах (с оптимумом 10–25 °C) [44].

Для синтеза AbF обычно используется несколько векторов. Компания «Progen» разработала новый вектор для клонирования, pOPE101, который обеспечивает биосинтез scFv в растворимой форме (рис. 2) в клетках *E. coli*. Он включает сильный IPTG-индуцируемый промотор T7, ген устойчивости к ампициллину, лидерную последовательность, обеспечивающую экспрессию белка в периплазме, и метку C-мус/His₆ для облегчения очистки. В случае scFv тяжёлую цепь клонировали по сайтам *NcoI* и *HindIII*, а лёгкую — по сайтам *MluI* и *NotI*. Две цепи соединялись линкером из 18 аминокислотных остатков, который делал возможной коэкспрессию двух целевых белков. Новый вектор pETDUET-1 (рис. 2), разработанный компанией «Novagen», содержит два сайта множественного клонирования (multiple cloning sites, MCS), в каждом из которых есть промотор T7. Сайт MSC2 заканчивается терминатором T7. Этот вектор также содержит метку His₆ в сайте MSC1 и метку S в сайте MSC2, его можно использовать с любым совместимым штаммом *E. coli* [40]. Вектор pETDUET-1 применяли, например, для синтеза gHu (биоаналога ранибизумаба) с выходом до 2,8 мг/л (в этом случае лёгкие и тяжёлые цепи клонировали в два MCS) [41].

УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДЛЯ СИНТЕЗА AbF С ВЫСОКИМ ВЫХОДОМ

Для высокого выхода AbF в клетках *E. coli* требуется оптимизировать множество параметров производства, таких как температура, перемешивание, время культивирования, аэрация, источники углерода, среда, тип индукции [42, 43].

Влияние температуры на выход AbF хорошо изучено. Хотя максимальная скорость роста *E. coli* наблюдается при 37 °C, экспрессию рекомбинантных антител оказалось лучше производить при более низких температурах (25 °C), поскольку её затрудняет деградация белка и формирование телец включения [45].

В нескольких исследованиях сообщалось, что сложные среды, такие как TB (terrific broth) или EnPresso, стимулируют рост клеток, что приводит к сверхэкспрессии продукта [46]. Однако насыщенность среды роста не оказывает существенного воздействия на выход белка, на который в большей степени влияет аминокислотная последовательность, чем состав среды [47].

Оптимизация концентрации источников углерода (глюкоза, глицерол, лактоза, глицин) может положительно влиять на экспрессию AbF. Как правило, снижение концентрации глюкозы и увеличение содержания глицерола в среде увеличивает количество внеклеточных VHH [48]. Глицин воздействует на пептидогликановый слой бактериальной клеточной стенки, что увеличивает проницаемость клеток, и белки могут легче выходить в культуральную среду.

После того, как было открыто, что 13% последовательности VHH представлено остатками глицина, добавка глицина в среду для культивирования стала использоваться для снижения метаболической нагрузки; глицин действует как предшественник в синтезе AbF [49].

Снижение концентрации IPTG иногда может улучшать растворимость и активность синтезируемых белков за счёт снижения их экспрессии. Оптимальная концентрация IPTG зависит от конкретного белка и должна подбираться для каждого AbF. Сообщается о широком диапазоне возможных концентраций IPTG (от 0,005 до 5 мМ), хотя наиболее часто используемая концентрация IPTG для T7 lac-промотора составляет 1 мМ. В некоторых случаях нет необходимости использовать максимально возможную концентрацию IPTG, поскольку это может перегрузить клетку и индуцировать формирование телец включения. Напротив, низкий уровень IPTG часто сокращает образование телец включения и улучшает фолдинг и стабильность белка [46].

ЭКСПРЕССИЯ AbF В ДРОЖЖАХ

Хотя у продукции AbF в *E. coli* есть преимущества (быстрый рост клеток, лёгкость манипуляций и минимальная сложность среды), у неё также есть и недостатки, в том числе формирование телец включения из-за окисляющей внутриклеточной среды. Чтобы получить растворимые функциональные антитела из телец включения, требуется дополнительный рефолдинг [50]. Это привело к разработке эукариотических систем экспрессии. Самым доступным эукариотическим организмом для продукции рекомбинантных белков являются дрожжи. У этих одноклеточных эукариот есть многочисленные преимущества. Дрожжи легко растут на простых средах и достигают высокой плотности клеток при культивировании в малых и больших масштабах. Биохимия, генетика и клеточная биология дрожжей хорошо изучены, что позволяет легко проводить с ними генетические манипуляции. Как система экспрессии рекомбинантных белков, дрожжи поддерживают продукцию маленьких и больших (более 50 кДа) белков с высоким выходом и низким уровнем загрязнения эндогенными белками [51]. Дрожжи секретируют только несколько собственных белков, что облегчает очистку выделяемых во внеклеточное пространство рекомбинантных белков. Кроме того, дрожжи обеспечивают гликозилирование, метилирование, ацилирование,

формирование дисульфидных мостиков и другие посттрансляционные модификации для экспрессируемых гетерологичных белков эукариотического происхождения [52, 53]. Производство белков с помощью дрожжей малозатратно, и процесс их получения в ферментёрах легко масштабируется. Дрожжи также гораздо более толерантны к таким факторам ферментации, как pH, присутствие ингибиторов ферментации, высокая концентрация сахара и этанола и т.д., по сравнению с клетками *E. coli* (табл. 3) [54].

Распространённые виды дрожжей (табл. 4), используемые в качестве клеток-хозяев экспрессии рекомбинантных белков, могут являться неметилотрофными (*Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis*) и метилотрофными (*Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Candida boidinii*). *S. cerevisiae* и *P. pastoris* соответственно представляют две группы, наиболее часто используемые для продукции белков с терапевтическим применением [57].

S. cerevisiae является непатогенным организмом, в целом признанным безопасным (generally recognized as safe, GRAS), что способствовало его использованию в пищевой промышленности. Геном штамма *S. cerevisiae* S288C был первым полностью секвенированным эукариотическим геномом [58], который дал огромное количество информации о генетике и клеточной биологии дрожжей и сделал возможным лёгкость генетического манипулирования этим видом. Достижения в области генной инженерии, стабильность системы экспрессии и лёгкость культивирования сделали *S. cerevisiae* перспективным хозяином для биосинтеза mAb и AbF. Продукция VHH ламы в *S. cerevisiae* является хорошо отлаженным промышленным процессом с выходом до сотен мг/л [59]. В промышленности и исследованиях применяется широкий спектр штаммов дрожжей, а для экспрессии рекомбинантных белков чаще всего используется штамм BJ5464.

Для экспрессии рекомбинантных белков требуется трансформация клетки-хозяина химическим способом или электропорацией (рис. 3) для введения вектора, несущего интересующий ген. Благодаря быстрой пролиферации дрожжей вектор размножается вместе с целевым геном. Многие эукариотические векторы, так называемые челночные, могут существовать как в бактериальных, так и в эукариотических клетках. У них два ориджина репликации и два набора маркерных генов, один из которых функционирует в *E. coli*, а другой — в эукариотической системе экспрессии, чаще всего дрожжах. Существует три типа векторов экспрессии

Таблица 3. Характеристики прокариотических и эукариотических систем экспрессии [55, 56]

Клетка-хозяин для экспрессии	Прокариотическая (<i>E. coli</i>)	Эукариотическая (дрожжевая)
Рост	быстрый рост (30 мин)	быстрый рост (90 мин)
Сложность среды	минимальная	минимальная
Стоимость производства	низкая	низкая
Возможность масштабирования производства	высокая	высокая
Внеклеточная экспрессия	отсутствует, секреция в периплазму	присутствует, секреция в среду культивирования
Фолдинг белка	обычно требуется рефолдинг	рефолдинга не требуется
Посттрансляционные модификации	отсутствие эукариотических посттрансляционных модификаций	различные посттрансляционные модификации, сильное гликозилирование маннозы
Риск загрязнения	средний (например, эндотоксинами)	низкий
Тип белка	белки низкой молекулярной массы	белки низкой и высокой молекулярной массы

Таблица 4. Наиболее часто используемые штаммы *S. cerevisiae* и *P. pastoris*

Дрожжи	Штаммы
<i>S. cerevisiae</i>	BY4716, W303, S288c, A634A, CEN.PK BJ5464, Σ 1278b, SK1, BY4741, BY4742, BY4743
<i>P. pastoris</i>	дикий тип (Y-11430, X-33) штаммы с различными способностями к использованию метанола (Mut ⁺ , Mut ^s , Mut ⁻) штаммы с отсутствием протеазной активности (SMD1163, SMD1165, SMD1168) штаммы с отсутствием гистидиндегидрогеназы (GS115, KM71, SMD1168)

для *S. cerevisiae*: эписомальные плазмиды (episomal plasmids, YEр), интегрирующиеся плазмиды (integrating plasmids, YIp) и центромерные плазмиды (centromeric plasmids, YCp).

YEр являются наиболее часто используемыми векторами как для внутри-, так и внеклеточной продукции гетерологичных белков. Эти векторы получены из небольшой (2 мкм) круговой плазмиды, множественные копии которой присутствуют во многих встречающихся в природе штаммах *S. cerevisiae*. Плазмида реплицируется независимо от хромосом дрожжей, так как содержит собственный ориджин репликации. Отбор клонов *S. cerevisiae* основан на использовании мутантных (ауксотрофных) штаммов, которым для роста требуется конкретная аминокислота (гистидин, триптофан, лейцин) или нуклеотид (урацил); они могут расти на минимальной среде только тогда, когда она дополнена соответствующим питательным веществом. В векторе содержится функциональный ген дикого типа, восполняющий мутантный ген хозяина.

У YIp отсутствует ориджин репликации, и они встраиваются в геном хозяина, в то время как YCp могут реплицироваться автономно в клетке-хозяине в небольшом количестве копий.

Гетерологичные гены помещаются под контроль особых промоторов для увеличения уровня экспрессии [50, 60]. Эти промоторы могут быть конститутивными, т.е. постоянно активными, или индуцируемыми, т.е. активируемыми специфическими стимулами. Стимулы для промоторов, полученных из генов *S. cerevisiae*, обеспечивают эффективную транскрипцию гетерологичных генов, помещённых в эписомальные векторы. Легко регулируемые индуцируемые промоторы необходимы для одновременного синтеза нескольких гетерологичных белков. Например, промоторы, индуцируемые галактозой, быстро отвечают на её добавление и усиливают транскрипцию до 1000 раз [61]. В клетках *S. cerevisiae* галактоза метаболизируется в последовательности реакций до глюкозо-6-фосфата, который вступает в гликолиз или пентозофосфатный путь.



Рис. 3. Экспрессия AbF в дрожжах: необходимый ген клонируют в векторе экспрессии, дрожжевые клетки трансформируют получившейся конструкцией, оптимизируют процесс ферментации; AbF производят в большом масштабе и анализируют их профили гликозилирования. Создано с использованием ресурса BioRender.com с разрешения

Такое превращение необходимо, поскольку гликолитические ферменты не распознают галактозу. Этот принцип используется для экспрессии гетерологичных белков в дрожжах с использованием промоторов *GAL1* и *GAL10*, которые строго регулируют экспрессию генов метаболизма галактозы. Галактоза является непривычным питательным веществом для дрожжей, которое может использоваться в качестве единственного источника углерода при отсутствии глюкозы в среде [62].

Производство рекомбинантных VHH ламы в достаточном количестве — хорошо отработанный промышленный процесс, который возможен благодаря стабильности и растворимости молекулы VHH. Растворимость VHH вызвана его гидрофильностью, которая делает возможной секрецию VHH из эндоплазматического ретикула (ЭР). В отличие от VHH, производные scFv более гидрофобны, а поэтому менее растворимы и могут накапливаться в ЭР [63]. Эту проблему можно решить путём создания штаммов дрожжей со сверхэкспрессией шаперонов и фолдаз, т.е. белков, обеспечивающих корректный фолдинг с последующей секрецией scFv [64]. Также создаются новые штаммы для увеличения общей способности дрожжей к секреции; такого результата можно достичь, управляя внутриклеточным перемещением белков, уменьшая их расщепление протеазами и контролируя ответ на тепловой шок, что ведёт к более высокому уровню продукции белка [50].

AbF не гликозилированы и, следовательно, могут экспрессироваться в дрожжах. Так, *S. cerevisiae* использовали для получения таких основанных на AbF лекарств, как ранибизумаб (Ran, Fab-фрагмент), пекселизумаб (Pex; scFv-пептид) и другие (табл. 5). Для этого использовался штамм B184 с существенно повышенным синтезом α -амилазы, полученный из штамма AAC за счёт случайного мутагенеза и микрофлюидного скрининга. Удаление амилазной плазмиды из штамма B184 дало штамм HA, который затем трансформировали плазмидой, созданный путём введения нанотела Nan (состоящего из одного домена V-типа), генов антител Pex и Ran в вектор CROTud. Хотя три фрагмента антител обладают различной молекулярной массой и посттрансляционными модификациями, все они успешно экспрессировались в штамме HA *S. cerevisiae* [65].

Гиперманнозилирование может привести к понижению активности, повышению иммуногенности, уменьшению периода полувыведения из сыворотки и снижению терапевтической эффективности гликопротеинов (рис. 3). Однако в случае AbF гиперманнозилирования можно избежать путём инактивации генов маннозилтрансфераз *Mnn2p* и *Mnn11p*, отвечающих за этот тип гликозилирования. Нокаут гена *Och1p*, кодирующего α -1,6-маннозилтрансферазу, также увеличил продукцию рекомбинантных белков, в том числе AbF. Следовательно, модификация N-гликозилирования может приводить к усилению секреции белков [66].

Таблица 5. Терапевтические AbF, синтезированные в *S. cerevisiae* и получившие одобрение FDA либо проходящие клинические испытания

Непатентованное название	Назначение	Структура	Год одобрения
Пекселизумаб (Pex, гуманизированный)	аортокоронарное шунтирование и ангиопластика	scFv	в фазе 3
Ранибизумаб (Rap, гуманизированный)	макулярная дегенерация	Fab	2006
Вобарилизумаб (ALX-0061)	ревматоидный артрит, системная красная волчанка	бивалентные биспецифичные VHH	в фазе 2
ALX-0171	инфекции нижних дыхательных путей, профилактика РСВ-инфекции	тривалентные VHH	в фазе 2

Многие гетерологичные гены клонированы вместе с сигнальной последовательностью, кодирующей пептид, облегчающий перенос рекомбинантного белка через клеточную мембрану и его выход во внешнюю среду. Добавление сигнальной последовательности может существенно упростить процесс очистки белка. Чаще всего в дрожжах используется сигнальная последовательность, полученная из гена фактора спаривания $\alpha 1$ (mating factor $\alpha 1$, MF $\alpha 1$) (рис. 3). Обычно её вводят непосредственно перед интересующим геном [67]. Помимо сигнальной последовательности, экспрессируемый ген может содержать метку (чаще на C-конце), которая облегчает очистку белка и его количественное определение. Чаще всего используются такие метки, как полигистидиновая и GFP [62]. Так, scFv-фрагмент с присоединённым к C-концу GFP был синтезирован в штамме *S. cerevisiae* BJ5464, и для отслеживания его внутриклеточного процессинга использовалась флуоресценция GFP [68].

Однако, у дрожжей *S. cerevisiae* есть некоторые ограничения, в числе которых нестабильность плазмид, гипергликозилирование и низкий выход белка. Это послужило причиной разработки альтернативных систем экспрессии, включая метилотрофные дрожжи *P. pastoris*.

Как и *S. cerevisiae*, *P. pastoris* является одноклеточным эукариотическим организмом со статусом GRAS [50], который можно легко подвергать генетическим манипуляциям и культивировать. Клетки *P. pastoris* дают множество посттрансляционных модификаций, таких как правильный фолдинг белка, гликозилирование и формирование дисульфидных связей. По сравнению с клетками насекомых или млекопитающих клетки *P. pastoris* дают возможность проводить более быстрый, лёгкий и выгодный синтез рекомбинантных белков. Главным преимуществом *P. pastoris* по сравнению с *S. cerevisiae* является более низкая степень гетерологического гликозилирования

белков [52]. Использование *P. pastoris* для контролируемой экспрессии гетерологичных белков возможно благодаря существованию хорошо регулируемых и эффективных промоторов, возможности выращивать клетки до высокой плотности в биореакторах на простой среде, а также секретиции небольшого количества эндогенных белков, что существенно упрощает очистку белковых продуктов [67].

Вектор для трансформации *P. pastoris* должен быть линеаризован для эффективной интеграции в дрожжевой геном путём гомологичной рекомбинации с формированием стабильных трансформантов. Для экспрессии гетерологичных белков часто применяется индуцируемый промотор гена алкогольоксидазы, *AOX1*, с использованием метанола в качестве индуктора. Этот промотор ингибируется глюкозой, глицеролом и большинством других источников углерода [62, 69]. В качестве альтернативы можно использовать конститутивные промоторы, поскольку уровень экспрессии, который они обеспечивают, аналогичен таковому для индуцируемых. Наиболее часто применяемый конститутивный промотор – *pGAP*, который в норме регулирует экспрессию гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы [62].

Некоторые векторы экспрессии *P. pastoris* содержат дополнительную последовательность (например, пре-про-последовательность MF $\alpha 1$ *S. cerevisiae*) непосредственно после промотора, которая служит сигналом секреции экспрессируемого белка [69]. Очистка секретируемого белка достигается главным образом за счёт сепарации среды ферментации от дрожжевой биомассы путём центрифугирования. После этого рекомбинантные белки можно концентрировать и очищать различными методами, такими как ультрафильтрация, преципитация или хроматография, в зависимости от свойств целевого белка. В качестве примера упомянем производство нанотела анти-CEACAM5 в *P. pastoris* GS115 под контролем промотора

pGAP с выходом ~50 мг/л. Очищенные нанотела использовались в раннем обнаружении карциноэмбрионального антигена (carcinoembryonic antigen, CEA) в сыворотке у пациентов с опухолями желудочно-кишечного тракта [70].

Отбор трансформированных клонов клеток-хозяев ведётся за счёт введения генов устойчивости к антибиотикам. Существует две группы векторов, которые придают клетке-хозяину устойчивость к канамицину (pPIC3K и pPIC9K) и зеоцину (pPICZ) соответственно [57]. Эти векторы также содержат уникальные сайты для эндонуклеаз рестрикции, используемые для клонирования целевых генов, а также последовательности меток (6×His или GFP), которые позволяют проводить более простую очистку гетерологичных белков.

Новая система экспрессии белка в *P. pastoris* под названием PichiaPink может производить белок в больших количествах (до 12 г/л). Она была представлена компанией «Thermo Fischer Scientific» (США). Разница между штаммом, используемым в данной системе, и обычными штаммами заключается в методе отбора, основанном на комплементарности адениновых ауксотрофов (а не на устойчивости к антибиотикам). На настоящий момент существует четыре штамма, которые можно использовать для трансформации и внеклеточной экспрессии белка. Белки переносятся во внеклеточную среду с помощью восьми последовательностей секреции. Преимущество такой системы экспрессии в том, что её легко масштабировать от низких до больших объёмов ферментации [52].

Впервые *P. pastoris* использовали как систему экспрессии для получения человеческих AbF LR и 10FG2, которые клонировали в вектор pPICZαA и экспрессировали в штамме *P. pastoris* X33. Вектор содержал сигнальную последовательность секреции α-фактора, что делало возможной внеклеточную экспрессию рекомбинантных белков. Оба экспрессированных AbF могли связывать токсины скорпиона, показывая, что их биохимические и функциональные свойства остались неизменными. Кроме того, выход рекомбинантных белков в *P. pastoris* был выше, чем в клетках *E. coli* [71].

СТРАТЕГИИ УЛУЧШЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ AbF В ДРОЖЖАХ

Стратегии улучшения продукции гетерологичных белков основаны на варьировании условий (температуры, времени инкубации, концентрации субстрата) культивирования *S. cerevisiae* и *P. pastoris*. В качестве источ-

ника углерода дрожжи *S. cerevisiae* используют 2%-ную глюкозу или 2%-ную раффинозу, экспрессия дрожжей в них индуцируется добавлением к среде 2%-ной галактозы. Для экспрессии рекомбинантных AbF клетки *S. cerevisiae* обычно выращивают при 28–30 °C [72]. Ещё одним компонентом, необходимым для роста клеток, является метанол, используемый в качестве источника углерода. Он также индуцирует экспрессию генов, тем самым увеличивая продукцию белков. Однако чрезмерно высокие концентрации метанола (более 5%) могут быть вредны из-за формирования токсичных продуктов, в то время как его низкие концентрации (ниже 1%) вызывают протеолитическое расщепление гетерологичных белков. Оптимальная концентрация метанола – 2–2,5% [55]. Экспрессию белка можно улучшить введением 0,5–1,0%-ного сорбитола в дополнение к метанолу. Сорбитол является источником углерода, который не индуцирует и не подавляет промотор AOX, поэтому выращивание дрожжей на смеси метанол/сорбитол снижает токсические эффекты метанола, а также повышает плотность клеток и производительность всего процесса [55, 73].

Ещё одним важным фактором для выращивания *P. pastoris* является температура. Оптимальная температура для этих дрожжей составляет 30 °C. Её повышение до 32 °C вызывает клеточную смерть и понижение экспрессии белка, а снижение температуры ниже 28 °C обеспечивает жизнеспособность клеток, уменьшает протеолитическое расщепление экспрессируемого белка и увеличивает его выход [55, 74]. Ещё одним критическим фактором, влияющим на продукцию белка, является время экспрессии. Для получения достаточной клеточной биомассы клетки *P. pastoris* выращиваются 96 ч. Однако сообщалось, что долгое время выращивания клеток влияет на протеолитическую деградацию рекомбинантных белков. Следовательно, для успешной продукции белка требуется оптимизация времени инкубации. Было обнаружено, что экспрессия белка происходит главным образом в интервале между 72 и 96 ч, хотя начаться может уже через 48 ч после индукции роста [55, 75].

Клетки *P. pastoris* оказались прекрасным хозяином экспрессии для синтеза AbF. Два рекомбинантных нанотела, полученных в *P. pastoris* – ALX061 и ALX00171 – нашли применение в лечении ревматоидного артрита и респираторно-синцитиальной инфекции (PCV – respiratory syncytial virus, RSV) соответственно [50]. Некоторые AbF использовались для молекулярной визуализации – например,

scFv, направленный на ген специфических калиевых каналов сердца у человека (human ether-a-go-go-related gene 1, hERG1), который является отличительным признаком зарождающихся опухолей. Нативный анти-hERG1 scFv и его мутантный анти-hERG1-вариант scFv-Cys были синтезированы в клетках *P. pastoris* GS115. Максимальный уровень экспрессии белка достигался через 72 ч после её индукции. Мутантный вариант scFv-hERG1-Cis, в котором остаток цистеина заменял фенилаланин в каркасном участке 3 домена VH, был более стабилен в сыворотке и обладал большей аффинностью к антигену hERG1 на поверхности клеток, что делает его удобным инструментом для молекулярной визуализации и диагностики рака *in vivo* [76].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И БУДУЩИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ

Продукция AbF была протестирована во множестве эукариотических и прокариотических систем экспрессии, например, в клетках млекопитающих, трансгенных животных, трансгенных растениях, клетках насекомых, нитчатых грибах, водорослях, простейших, дрожжах и бактериях. Однако у *E. coli* есть ряд уникальных по сравнению с другими системами преимуществ, особенно для крупномасштабного производства. Несомненно, клетки *E. coli* имеют множество преимуществ, включая быстрый рост, высокий уровень экспрессии, возможности для генной инженерии благодаря обширным познаниям о генетике и молекулярной биологии этого организма, большое количество векторов экспрессии, мутантных штаммов клеток-хозяев и экономически выгодные среды/условия культивирования.

За два последних десятилетия дрожжевые системы экспрессии стали обычным явлением в продукции рекомбинантных AbF. У них есть ряд преимуществ перед бактериями, поскольку они непатогенны, легко выращиваются и обеспечивают высокий уровень экспрессии рекомбинантных белков. В отличие от прокариотических систем экспрессии, дрожжевые могут производить антитела с подобными человеческим паттернами гликозилирования. Экспрессия в бактериальных клетках часто приводит к формированию телец включения, в то время как дрожжи обеспечивают правильный фолдинг белка и формирование функциональных белков. Сигнальные последовательности дают возможность прямо секретировать белок в среду, что облегчает дальнейший процесс

его очистки. Выход рекомбинантных белков в дрожжах высок и может достигать от миллиграммов до граммов на литр. Таким образом, дрожжи обеспечивают быструю и экономически выгодную продукцию рекомбинантных белков.

Другими системами, разработанными для экспрессии терапевтических AbF, являются клетки млекопитающих, растения и бакуловирусы. Клетки млекопитающих — это единственная система экспрессии, которая может продуцировать нативные белки человека с правильными паттернами посттрансляционных модификаций. Экспрессия в клетках млекопитающих является дорогостоящей, сложной и времязатратной, а её выход часто низок. Очистка AbF, продуцированных в системах млекопитающих, требует удаления вирусов, что прибавляет дополнительный уровень сложности ко всей процедуре [9].

Растительные системы экспрессии также дают ряд преимуществ, включая низкую стоимость производства и высокий выход белка. Несмотря на то, что в таких системах белки могут проходить корректный фолдинг, их посттрансляционные модификации, особенно гликозилирование, отличаются от таковых в человеческих клетках и могут приводить к иммуногенности для таких AbF, что ограничивает возможности применения трансгенных растений. В зависимости от использованных промоторов синтезированные в растениях белки могут запасаться в листьях, семенах или же в тех и других. Хотя экспрессия белков может быть высокой, их препараты также могут быть загрязнены другими веществами, такими как полифенолы и протеазы, которые затрудняют очистку [9].

Бакуловирусные системы экспрессии являются прекрасной платформой для синтеза и посттрансляционных модификаций белков человека. По сравнению с другими системами они обладают выдающейся гибкостью и возможностью синтеза по принципу «включай и работай» в системах бакуловирус/клетка насекомого. Хотя разработка систем экспрессии AbF в клетках насекомых и растений ещё находится на ранней стадии как в части исследований, так и в клинических условиях, эти системы потенциально способны радикально изменить всю сферу синтеза и разработки AbF за счёт быстрой и экономически выгодной их экспрессии.

Вклад авторов. М.Р. — руководство работой; L.F., N.Z., М.Р. — написание и редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа была финансирована Министерством образования, науки и технологического развития Республики Сербия (контракты №№ 451-03-47/2023-01/200168, 451-03-47/2023-01/200288 и 451-03-47/2023-01/200026).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Данная статья не содержит описания проведённых авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mitra, S., and Tomar, P. C. (2021) Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects, *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, **19**, 159, doi: 10.1186/s43141-021-00264-6.
2. Liu, J. K. (2014) The history of monoclonal antibody development – progress, remaining challenges and future innovations, *Ann. Med. Surg. (Lond)*, **3**, 113–116, doi: 10.1016/j.amsu.2014.09.001.
3. De Marco, A. (2011) Biotechnological applications of recombinant single-domain antibody fragments, *Microb. Cell Fact.*, **10**, 44, doi: 10.1186/1475-2859-10-44.
4. Geyer, C. R., McCafferty, J., Dubel, S., Bradbury, A. R., and Sidhu, S. S. (2012) Recombinant antibodies and in vitro selection technologies, *Methods Mol. Biol.*, **901**, 11–32, doi: 10.1007/978-1-61779-931-0_2.
5. Ahmad, Z. A., Yeap, S. K., Ali, A. M., Ho, W. Y., Alitheen, N. B., and Hamid, M. (2012) scFv antibody: principles and clinical application, *Clin. Dev. Immunol.*, **2012**, 980250, doi: 10.1155/2012/980250.
6. Pluen, A., Boucher, Y., Ramanujan, S., McKee, T. D., Gohongi, T., di Tomaso, E., Brown, E. B., Izumi, Y., Campbell, R. B., Berk, D. A., and Jain, R. K. (2001) Role of tumor-host interactions in interstitial diffusion of macromolecules: cranial vs. subcutaneous tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4628–4633, doi: 10.1073/pnas.081626898.
7. Khawli, L. A., Biela, B., Hu, P., and Epstein, A. L. (2003) Comparison of recombinant derivatives of chimeric TNT-3 antibody for the radioimaging of solid tumors, *Hybrid Hybridomics*, **22**, 1–9, doi: 10.1089/153685903321538026.
8. Thurber, G. M., and Wittrup, K. D. (2008) Quantitative spatiotemporal analysis of antibody fragment diffusion and endocytic consumption in tumor spheroids, *Cancer Res.*, **68**, 3334–3341, doi: 10.1158/0008-5472.Can-07-3018.
9. Pirkalkhoran, S., Grabowska, W. R., Kashkoli, H. H., Mirhassani, R., Guiliano, D., Dolphin, C., and Khalili, H. (2023) Bioengineering of antibody fragments: challenges and opportunities, *Bioengineering (Basel)*, **10**, 122, doi: 10.3390/bioengineering10020122.
10. Li, Z., Krippendorff, B. F., Sharma, S., Walz, A. C., Lavé, T., and Shah, D. K. (2016) Influence of molecular size on tissue distribution of antibody fragments, *MAbs*, **8**, 113–119, doi: 10.1080/19420862.2015.1111497.
11. Balthasar, J., and Fung, H. L. (1994) Utilization of antidrug antibody fragments for the optimization of intraperitoneal drug therapy: studies using digoxin as a model drug, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **268**, 734–739.
12. Dugel, P. U., Koh, A., Ogura, Y., Jaffe, G. J., Schmidt-Erfurth, U., Brown, D. M., Gomes, A. V., Warburton, J., Weichselberger, A., Holz, F. G., HAWK and HARRIER Study Investigators (2020) HAWK and HARRIER: phase 3, multicenter, randomized, double-masked trials of brolucizumab for neovascular age-related macular degeneration, *Ophthalmology*, **127**, 72–84, doi: 10.1016/j.ophtha.2019.04.017.
13. Popovic, M., Andjelkovic, U., Burazer, L., Lindner, B., Petersen, A., and Gavrovic-Jankulovic, M. (2013) Biochemical and immunological characterization of a recombinantly-produced antifungal cysteine proteinase inhibitor from green kiwifruit (*Actinidia deliciosa*), *Phytochemistry*, **94**, 53–59, doi: 10.1016/j.phytochem.2013.06.006.
14. Abughren, M., Popović, M., Dimitrijević, R., Burazer, L., Grozdanović, M., Atanasković-Marković, M., and Gavrovic-Jankulovic, M. (2012) Optimization of the heterologous expression of banana glucanase in *Escherichia coli*, *J. Serb. Chem. Soc.*, **77**, 43–52, doi: 10.2298/JSC110309158A.
15. Arbabi-Ghahroudi, M., Tanha, J., and MacKenzie, R. (2005). Prokaryotic expression of antibodies, *Cancer Metastasis Rev.*, **24**, 501–519, doi: 10.1007/s10555-005-6193-1.
16. Charlton, K. A. (2004) *Expression and Isolation of Recombinant Antibody Fragments in E. coli*. in *Antibody Engineering: Methods and Protocols* (Lo, B. K. C., ed) Humana Press, Totowa, NJ, pp. 245–254.
17. Walsh, G. (2010) Biopharmaceutical benchmarks 2010, *Nat. Biotechnol.*, **28**, 917–924, doi: 10.1038/nbt0910-917.
18. Kang, T. H., and Seong, B. L. (2020) Solubility, stability, and avidity of recombinant antibody fragments expressed in microorganisms, *Front. Microbiol.*, **11**, 1927, doi: 10.3389/fmicb.2020.01927.
19. Choi, J., and Lee, S. (2004) Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**, 625–635, doi: 10.1007/s00253-004-1559-9.
20. Sandomenico, A., Sivaccumar, J. P., and Ruvo, M. (2020) Evolution of *Escherichia coli* expression system

- in producing antibody recombinant fragments, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 6324, doi: 10.3390/ijms21176324.
21. Challener, C. A. (2015) Fermentation for the future, *BioPharm Int.*, **28**, 30-31.
 22. Basu, A., Li, X., and Leong, S. S. J. (2011) Refolding of proteins from inclusion bodies: rational design and recipes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **92**, 241-251, doi: 10.1007/s00253-011-3513-y.
 23. Popovic, M., Mazzega, E., Toffoletto, B., and de Marco, A. (2018) Isolation of anti-extra-cellular vesicle single-domain antibodies by direct panning on vesicle-enriched fractions, *Microb. Cell Factor.*, **17**, 6, doi: 10.1186/s12934-017-0856-9.
 24. De Marco, A. (2022) Cytoplasmic production of nanobodies and nanobody-based reagents by co-expression of sulfhydryl oxidase and DsbC isomerase, *Methods Mol. Biol.*, **2446**, 145-157, doi: 10.1007/978-1-0716-2075-5_7.
 25. Veggiani, G., and de Marco, A. (2011) Improved quantitative and qualitative production of single-domain intrabodies mediated by the co-expression of Erv1p sulfhydryl oxidase, *Protein Express. Purif.*, **79**, 111-114, doi: 10.1016/j.pep.2011.03.005.
 26. Rahbarizadeh, F., Rasaei, M. J., Forouzandeh-Moghadam, M., and Allameh, A.-A. (2005) High expression and purification of the recombinant camelid anti-MUC1 single domain antibodies in *Escherichia coli*, *Protein Express. Purif.*, **44**, 32-38, doi: 10.1016/j.pep.2005.04.008.
 27. Djender, S., Schneider, A., Beugnet, A., Crepin, R., Desrumeaux, K. E., Romani, C., Moutel, S., Perez, F., and de Marco, A. (2014) Bacterial cytoplasm as an effective cell compartment for producing functional VHH-based affinity reagents and *Camelidae* IgG-like recombinant antibodies, *Microb. Cell Factor.*, **13**, 140, doi: 10.1186/s12934-014-0140-1.
 28. Gaciarz, A., Veijola, J., Uchida, Y., Saaranen, M. J., Wang, C., Hörkö, S., and Ruddock, L. W. (2016) Systematic screening of soluble expression of antibody fragments in the cytoplasm of *E. coli*, *Microb. Cell Factor.*, **15**, 22, doi: 10.1186/s12934-016-0419-5.
 29. Humphreys, D. P., Sehdev, M., Chapman, A. P., Ganesh, R., Smith, B. J., King, L. M., Glover, D. J., Reeks, D. G., and Stephens, P. E. (2000) High-level periplasmic expression in *Escherichia coli* using a eukaryotic signal peptide: importance of codon usage at the 5' end of the coding sequence, *Protein Express. Purif.*, **20**, 252-264, doi: 10.1006/prep.2000.1286.
 30. Ellis, M., Patel, P., Edon, M., Ramage, W., Dickinson, R., and Humphreys, D. P. (2017) Development of a high yielding *E. coli* periplasmic expression system for the production of humanized Fab' fragments, *Biotechnol. Prog.*, **33**, 212-220, doi: 10.1002/btpr.2393.
 31. Liu, M., Feng, X., Ding, Y., Zhao, G., Liu, H., and Xian, M. (2015) Metabolic engineering of *Escherichia coli* to improve recombinant protein production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **99**, 10367-10377, doi: 10.1007/s00253-015-6955-9.
 32. Selas Castiñeiras, T., Williams, S. G., Hitchcock, A. G., and Smith, D. C. (2018) *E. coli* strain engineering for the production of advanced biopharmaceutical products, *FEMS Microbiol. Lett.*, **365**, fny162, doi: 10.1093/femsle/fny162.
 33. Sørensen, H. P., and Mortensen, K. K. (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*, *J. Biotechnol.*, **115**, 113-128, doi: 10.1016/j.jbiotec.2004.08.004.
 34. Hayat, S. M., Farahani, N., Golichenari, B., and Sahebkar, A. (2018) Recombinant protein expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): what we need to know, *Curr. Pharmaceut. Design*, **24**, 718-725, doi: 10.2174/1381612824666180131121940.
 35. Pardon, E., Laeremans, T., Triest, S., Rasmussen, S. G., Wohlkönig, A., Ruf, A., Muyldermans, S., Hol, W. G., Kobilka, B. K., and Steyaert, J. (2014) A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology, *Nat. Protocols*, **9**, 674-693, doi: 10.1038/nprot.2014.039.
 36. Jember, T. F. (2021) Molecular cloning, expression and purification of recombinant VHH proteins expressed in *E. coli*, *Am. J. Mol. Biol.*, **11**, 129-141, doi: 10.4236/ajmb.2021.114011.
 37. Su, Q., Shi, W., Huang, X., Wan, Y., Li, G., Xing, B., Xu, Z. P., Liu, H., Hammock, B. D., Yang, X., Yin, S., and Lu, X. (2022) Screening, expression, and identification of nanobody against SARS-CoV-2 spike protein, *Cells*, **11**, 3355, doi: 10.3390/cells11213355.
 38. Hu, Y., Wang, Y., Lin, J., Wu, S., Muyldermans, S., and Wang, S. (2022) Versatile application of nanobodies for food allergen detection and allergy immunotherapy, *J. Agricult. Food Chem.*, **70**, 8901-8912, doi: 10.1021/acs.jafc.2c03324.
 39. Hemamalini, N., Ezhilmathi, S., and Mercy, A. A. (2020) Recombinant protein expression optimization in *Escherichia coli*: a review, *Ind. J. Animal Res.*, **54**, 653-660, doi: 10.18805/ijar.B-3808.
 40. Gupta, S. K., and Shukla, P. (2017) Microbial platform technology for recombinant antibody fragment production: a review, *Crit. Rev. Microbiol.*, **43**, 31-42, doi: 10.3109/1040841X.2016.1150959.
 41. Mehta, D., Chirmade, T., Tunekar, A. A., Gani, K., and Bhambure, R. (2021) Cloning and expression of antibody fragment (Fab) I: Effect of expression construct and induction strategies on light and heavy chain gene expression, *Biochem. Engin. J.*, **176**, 108189, doi: 10.1016/j.bej.2021.108189.
 42. Henry, K. A., Sulea, T., van Faassen, H., Hussack, G., Purisima, E. O., MacKenzie, C. R., and Arbabi-Ghahroudi, M. (2016) A rational engineering strategy for designing protein A-binding camelid single-domain antibodies, *PLoS One*, **11**, e0163113, doi: 10.1371/journal.pone.0163113.

43. Bossi, S., Ferranti, B., Martinelli, C., Capasso, P., and de Marco, A. (2010) Antibody-mediated purification of co-expressed antigen–antibody complexes, *Protein Express. Purif.*, **72**, 55–58, doi: 10.1016/j.pep.2010.01.003.
44. Jia, B., and Jeon, C. O. (2016) High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives, *Open Biol.*, **6**, 160196, doi: 10.1098/rsob.160196.
45. Farshdari, F., Ahmadzadeh, M., Nematollahi, L., and Mohit, E. (2020) The improvement of anti-HER2 scFv soluble expression in *Escherichia coli*, *Braz. J. Pharm. Sci.*, **56**, doi: 10.1590/s2175-97902019000317861.
46. Zarschler, K., Witecy, S., Kapplusch, F., Foerster, C., and Stephan, H. (2013) High-yield production of functional soluble single-domain antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli*, *Microb. Cell Factor.*, **12**, 97, doi: 10.1186/1475-2859-12-97.
47. Farasat, A., Rahbarizadeh, F., Ahmadvand, D., and Yazdian, F. (2017) Optimization of an anti-HER2 nanobody expression using the Taguchi method, *Prepar. Biochem. Biotechnol.*, **47**, 795–803, doi: 10.1080/10826068.2017.1342259.
48. Studier, F. W. (2005) Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures, *Protein Express. Purif.*, **41**, 207–234, doi: 10.1016/j.pep.2005.01.016.
49. Zou, C., Duan, X., and Wu, J. (2014) Enhanced extracellular production of recombinant *Bacillus deramificans* pullulanase in *Escherichia coli* through induction mode optimization and a glycine feeding strategy, *Biores. Technol.*, **172**, 174–179, doi: 10.1016/j.biortech.2014.09.035.
50. Spadiut, O., Capone, S., Krainer, F., Glieder, A., and Herwig, C. (2014) Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments, *Trends Biotechnol.*, **32**, 54–60, doi: 10.1016/j.tibtech.2013.10.002.
51. Demain, A. L., and Vaishnav, P. (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms, *Biotechnol. Adv.*, **27**, 297–306, doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.01.008.
52. Gupta, S. K., and Shukla, P. (2017) Sophisticated cloning, fermentation, and purification technologies for an enhanced therapeutic protein production: a review, *Front. Pharmacol.*, **8**, 419, doi: 10.3389/fphar.2017.00419.
53. Vieira Gomes, A. M., Souza Carmo, T., Silva Carvalho, L., Mendonça Bahia, F., and Parachin, N. S. (2018) Comparison of yeasts as hosts for recombinant protein production, *Microorganisms*, **6**, 38, doi: 10.3390/microorganisms6020038.
54. Hong, M. S., Velez-Suberbie, M. L., Maloney, A. J., Biedermann, A., Love, K. R., Love, J. C., Mukhopadhyay, T. K., and Braatz, R. D. (2021) Macroscopic modeling of bioreactors for recombinant protein producing *Pichia pastoris* in defined medium, *Biotechnol. Bioeng.*, **118**, 1199–1212, doi: 10.1002/bit.27643.
55. Karbalaee, M., Rezaee, S. A., and Farsiani, H. (2020) *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins, *J. Cell. Physiol.*, **235**, 5867–5881, doi: 10.1002/jcp.29583.
56. De Sá Magalhães, S., and Keshavarz-Moore, E. (2021) *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) as a cost-effective tool for vaccine production for low- and middle-income countries (LMICs), *Bioengineering (Basel)*, **8**, 119, doi: 10.3390/bioengineering8090119.
57. Baghban, R., Farajnia, S., Rajabibazl, M., Ghasemi, Y., Mafi, A., Hoseinpoor, R., Rahbarnia, L., and Aria, M. (2019) Yeast expression systems: overview and recent advances, *Mol. Biotechnol.*, **61**, 365–384, doi: 10.1007/s12033-019-00164-8.
58. Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., and Oliver, S. G. (1996) Life with 6000 genes, **274**, 546–567, doi: 10.1126/science.274.5287.546.
59. Gorlani, A., de Haard, H., and Verrips, T. (2012) Expression of VHHs in *Saccharomyces cerevisiae*, *Methods Mol. Biol.*, **911**, 277–286, doi: 10.1007/978-1-61779-968-6_17.
60. Chee, M. K., and Haase, S. B. (2012) New and re-designed pRS plasmid shuttle vectors for genetic manipulation of *Saccharomyces cerevisiae*, *G3 (Bethesda, Md.)*, **2**, 515–526, doi: 10.1534/g3.111.001917.
61. Berlec, A., and Strukelj, B. (2013) Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells, *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 257–274, doi: 10.1007/s10295-013-1235-0.
62. Carlesso, A., Delgado, R., Ruiz Isant, O., Uwangué, O., Valli, D., Bill, R. M., and Hedfalk, K. (2022) Yeast as a tool for membrane protein production and structure determination, *FEMS Yeast Res.*, **22**, foac047, doi: 10.1093/femsyr/foac047.
63. Joosten, V., Lokman, C., van den Hondel, C. A., and Punt, P. J. (2003) The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeasts and filamentous fungi, *Microb. Cell Factor.*, **2**, 1, doi: 10.1186/1475-2859-2-1.
64. Xu, P., Raden, D., Doyle, F. J., 3rd, and Robinson, A. S. (2005) Analysis of unfolded protein response during single-chain antibody expression in *Saccharomyces cerevisiae* reveals different roles for BiP and PDI in folding, *Metab. Engin.*, **7**, 269–279, doi: 10.1016/j.ymben.2005.04.002.
65. Wang, Y., Li, X., Chen, X., Nielsen, J., Petranovic, D., and Siewers, V. (2021) Expression of antibody fragments in *Saccharomyces cerevisiae* strains evolved for enhanced protein secretion, *Microb. Cell Fact.*, **20**, 134, doi: 10.1186/s12934-021-01624-0.
66. Tang, H., Wang, S., Wang, J., Song, M., Xu, M., Zhang, M., Shen, Y., Hou, J., and Bao, X. (2016) N-hypermannose glycosylation disruption enhances recombinant protein production by regulating secretory pathway and cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*, *Scientific reports*, **6**, 25654, doi: 10.1038/srep25654.

67. Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., and Schwab, H. (2014) Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 5301-5317, doi: 10.1007/s00253-014-5732-5.
68. Huang, D., and Shusta, E. V. (2006) A yeast platform for the production of single-chain antibody-green fluorescent protein fusions, *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 7748-7759, doi: 10.1128/aem.01403-06.
69. Frenzel, A., Hust, M., and Schirrmann, T. (2013) Expression of recombinant antibodies, *Front. Immunol.*, **4**, 217, doi: 10.3389/fimmu.2013.00217.
70. Chen, Q., Zhou, Y., Yu, J., Liu, W., Li, F., Xian, M., Nian, R., Song, H., and Feng, D. (2019) An efficient constitutive expression system for Anti-CEACAM5 nanobody production in the yeast *Pichia pastoris*, *Protein Expr. Purif.*, **155**, 43-47, doi: 10.1016/j.pep.2018.11.001.
71. Gómez-Ramírez, I. V., Corrales-García, L. L., Posani, L. D., Riaño-Umbarila, L., and Becerril, B. (2023) Expression in *Pichia pastoris* of human antibody fragments that neutralize venoms of Mexican scorpions, *Toxicon*, **223**, 107012, doi: 10.1016/j.toxicon.2022.107012.
72. Guthrie, C., and Fink, G. R. (2002) *Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology, Part C*, Gulf Professional Publishing.
73. Gao, M.-J., Li, Z., Yu, R.-S., Wu, J.-R., Zheng, Z.-Y., Shi, Z.-P., Zhan, X.-B., and Lin, C.-C. (2012) Methanol/sorbitol co-feeding induction enhanced porcine interferon- α production by *P. pastoris* associated with energy metabolism shift, *Bioprocess Biosystems Engin.*, **35**, 1125-1136, doi: 10.1007/s00449-012-0697-1.
74. Gao, M. J., Zhan, X. B., Gao, P., Zhang, X., Dong, S. J., Li, Z., Shi, Z. P., and Lin, C. C. (2015) Improving performance and operational stability of porcine interferon- α production by *Pichia pastoris* with combinational induction strategy of low temperature and methanol/sorbitol co-feeding, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **176**, 493-504, doi: 10.1007/s12010-015-1590-6.
75. Farsiani, H., Mosavat, A., Soleimanpour, S., Sa-deghian, H., Akbari Eydgahi, M. R., Ghazvini, K., Sankian, M., Aryan, E., Jamehdar, S. A., and Rezaee, S. A. (2016) Fc-based delivery system enhances immunogenicity of a tuberculosis subunit vaccine candidate consisting of the ESAT-6:CFP-10 complex, *Mol. Bio-Systems*, **12**, 2189-2201, doi: 10.1039/c6mb00174b.
76. Duranti, C., Carraresi, L., Sette, A., Stefanini, M., Lottini, T., Crescioli, S., Crociani, O., Iamele, L., De Jonge, H., Gherardi, E., and Arcangeli, A. (2018) Generation and characterization of novel recombinant anti-hERG1 scFv antibodies for cancer molecular imaging, *Oncotarget*, **9**, 34972-34989, doi: 10.18632/oncotarget.26200.

RECENT DEVELOPMENTS IN BIOPROCESSING OF RECOMBINANT ANTIBODY FRAGMENTS

Review

N. Zelenovic¹, L. Filipovic², and M. Popovic^{3*}

¹ Center for Chemistry, Institute for Chemistry, Technology and Metallurgy, National Institute of Republic of Serbia, University of Belgrade, 11000 Belgrade, Serbia

² Innovative Centre, Faculty of Chemistry, University of Belgrade, 11000 Belgrade, Serbia

³ Department of Biochemistry, Faculty of Chemistry, University of Belgrade, 11000 Belgrade, Serbia; e-mail: la_bioquimica@chem.bg.ac.rs

Biotechnological and biomedical applications of antibodies have been on a steady rise since the 1980s. As unique and highly specific bioreagents, monoclonal antibodies (mAbs) have been widely exploited and approved as therapeutic agents. However, the use of mAbs has limitations for therapeutic applications. Antibody fragments (AbFs) with preserved antigen-binding sites have a significant potential to overcome the disadvantages of conventional mAbs, such as heterogeneous tissue distribution after systemic administration, especially in solid tumors, and Fc-mediated bystander activation of the immune system. AbFs possess better biodistribution coefficient due to lower molecular weight. They preserve the functional features of mAbs, such as antigen specificity and binding, while at the same time, ensuring much better tissue penetration. An additional benefit of AbFs is the possibility of their production in bacterial and yeast cells due to the small size, more robust structure, and lack of posttranslational modifications. In this review, we described current approaches to the AbF production with recent examples of AbF synthesis in bacterial and yeast expression systems and methods for the production optimization.

Keywords: antibody fragments, bacterial expression, yeast expression, scFv, VHH