

ПРОДУЦЕНТЫ, БИОЛОГИЯ, СЕЛЕКЦИЯ,
ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

УДК 577.112.083:616-097

АМПЛИФИКАЦИЯ κДНК ВАРИАБЕЛЬНЫХ ДОМЕНОВ АНТИТЕЛ,
ПРОИЗВОДИМЫХ ЕДИНИЧНЫМИ В-КЛЕТКАМИ ЧЕЛОВЕКА,
ДЛЯ СОЗДАНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

© 2023 г. М. А. Марьин¹, * , Н. А. Зенинская¹, М. А. Шкуратова¹, М. М. Рогозин¹, А. С. Карцева¹,
М. В. Силкина¹, Я. О. Романенко¹, А. К. Рябко¹, И. Г. Шемякин¹, В. В. Фирстова¹

¹Федеральное государственное учреждение науки “Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора”, Московская область, Оболensk, 142279 Россия

*e-mail: marin@obolensk.org

Поступила в редакцию 21.11.2022 г.

После доработки 07.02.2023 г.

Принята к публикации 08.02.2023 г.

Описан способ создания генетических конструкций для получения из единичных клеток рекомбинантных человеческих антител. Процесс начинают с изоляции В-лимфоцитов из периферической крови человека с помощью цитометрического сортирования, затем выполняют синтез первой цепи κДНК по технологии SMART с последующей полнотранскриптомной амплификацией, после чего проводят амплификацию участков, которые кодируют переменные (VH, Vκ и VL) домены иммуноглобулина G. Для этого нами предложено использовать 28 синтетических праймеров с суммарным числом нуклеотидов 924, включая некомплементарные вспомогательные 5'-участки. Конструкция праймеров обеспечивает получение пары линейных экспрессионных кассет для тяжелой и легкой цепи каждого тестируемого антитела из пары успешно амплифицированных полинуклеотидов с помощью сплайсинговой ПЦР. Совместная трансфекция линейных экспрессионных кассет в перевиваемые клетки млекопитающих позволяет синтезировать полноразмерный иммуноглобулин, специфичность и нейтрализующую способность которого можно быстро оценить в соответствующих тестах. В дальнейшем открытые рамки считывания цепей антитела можно клонировать в плазмидные векторы для создания стабильной экспрессирующей клеточной линии.

Ключевые слова: моноклональные антитела человека, рекомбинантные антитела, амплификация κДНК, единичные клетки, линейные экспрессионные кассеты

DOI: 10.56304/S0234275823010076

Антитела производятся В-клетками и способны специфически связываться с чужеродными молекулами (антигенами). Это взаимодействие оказывает определенный эффект, в частности может приводить к нейтрализации антигена. В настоящее время порядка 130 терапевтических (химерных, гумани-

зированных и полностью человеческих) моноклональных антител официально одобрены для лечения различных заболеваний (список по данным мониторинга Международной некоммерческой торговой ассоциации Antibody Society, Inc. представлен на сайте <https://www.antibodysociety.org/resources/approved-antibodies/>). Для терапии предпочтительно использовать полностью человеческие моноклональные антитела, получение которых связано с рядом трудностей.

Основные и доступные методы получения человеческих моноклональных антител основаны на использовании фагового дисплея, иммортализации В-клеток, гибридомной технологии, а также генетической инженерии с использованием κДНК единичных В-клеток доноров [1]. Каждый из методов достаточно сложен и требует больших усилий, много времени, определенной квалификации коллектива исследователей.

Список сокращений: Сκ (constant domain of the immunoglobulin κ light chain) – константный домен легкой цепи изотипа κ (каппа); Сλ (constant domain of the immunoglobulin λ light chain) – константный домен легкой цепи изотипа λ (лямбда); SMART (Switching Mechanism At the end of the 5'-end of the RNA Transcript) – механизм переключения образца на 5'-конце РНК-транскрипта; SOE-PCR (Splicing by Overlap Extension PCR) – ПЦР, соединяющая фрагменты ДНК благодаря перекрывающимся областям; V-домен – переменный домен; VH (variable heavy domain) – переменный домен тяжелой цепи; VL (variable light domain) – переменный домен легкой цепи; Vκ (variable domain of the immunoglobulin κ light chain) – переменный домен легкой цепи изотипа κ (каппа); Vλ (variable domain of the immunoglobulin λ light chain) – переменный домен легкой цепи изотипа λ (лямбда).

С развитием секвенирования нового поколения (NGS) и микрофлюидных технологий прочтение транскриптома единичных В-лимфоцитов больше не считается сложной и эксклюзивной задачей [2]. С их помощью получают информацию о структуре антител, но при этом кДНК каждой отдельно взятой клетки перестает существовать в изолированном нативном виде. Обладая информацией о последовательности переменных доменов (V-доменов) иммуноглобулина, нельзя достоверно установить его мишень. Необходимо экспериментальное подтверждение специфичности рекомбинантного антитела, переменная часть которого кодируется парой переменных доменов тяжелой цепи/переменный домен легкой цепи (VH/VL). Существуют проприетарные технологии, например HiFiBio CelliGO [3], которые позволяют возвращаться к амплификации и клонированию кДНК после микрофлюидного процесса. В остальных случаях после получения результатов секвенирования необходимо выполнять *de novo* синтез ДНК, кодирующих V-домены, как это сделали L. Liu и соавт. [4].

Известно несколько протоколов амплификации кДНК VH- и VL-доменов из каждой единичной В-клетки, которые выполняют “в пробирке”, без использования NGS. Такой подход считается классическим для получения человеческих моноклональных антител с нативно спаренными цепями. Сначала с помощью проточной цитометрии с функцией сортировки изолируют единичные В-клетки периферической крови, синтезирующие специфичные антитела; затем синтезируют кДНК с последующей двухэтапной амплификацией целевых полинуклеотидов. Если задан параметр сортировки клеток, продуцирующих только иммуноглобулин класса G (IgG), то необходимо провести амплификацию трех фрагментов кДНК: тяжелой цепи γ , легкой цепи κ , легкой цепи λ . Но в результате получают только два ампликона: тяжелой цепи и легкой цепи одного из изомеров. Различные транскрипты цепей иммуноглобулинов не имеют постоянного нуклеотидного состава в 5'-области. В то же время в регионе, кодирующем стык сигнального пептида и N-концевой части переменного домена цепи одного изомера, присутствует определенная нуклеотидная гомология. За переменным доменом следует константный, который кодируется относительно консервативной последовательностью. Следовательно, для амплификации каждого фрагмента необходимо иметь композицию из нескольких прямых 5'-праймеров и одного обратного 3'-праймера. Целые рекомбинантные антитела предпочтительнее производить в клетках млекопитающих [5]. Для этого полученные в результате амплификации фрагменты кДНК интегрируют в генетические конструкции, обеспечивающие синтез обеих цепей в клетке. Чаще всего получают две рекомбинантные

плазмиды для синтеза полноразмерных полипептидов тяжелой и легкой цепи, но также возможно получение двух линейных экспрессионных каскадов без процедуры лигирования кДНК [6].

Первый рациональный протокол амплификации Fab-фрагмента IgG κ и λ изомеров из единичных В-лимфоцитов и плазматических клеток представлен J. Coronella и соавт. [7] (см. рис. S1a Дополнительных материалов). Синтез кДНК запускали с олиго(dT)₁₆, затем проводили полувложенную ПЦР, где и на первом, и на втором этапе использовали одни и те же 5'-праймеры по Sblattero and Bradbury [8], соответствующие началу первого каркасного участка (FR1) в V-генных сегментах. Праймеры 3' для первой и второй ПЦР были комплементарны последовательностям в константных регионах и заимствованы у Burton and Barbas [9]. Для амплификации VH- и VL-доменов IgG использовали 29 олигонуклеотидов. В работе не стояла задача получения рекомбинантных ДНК тяжелой и легкой цепей с целью дальнейшей продукции антител. Несмотря на минимальное число олигонуклеотидов и относительно высокую эффективность одновременной амплификации VH и VL из единичной клетки (68% и 50% для плазматических и В-лимфоцитов соответственно), публикаций с применением этого протокола немного.

В настоящее время для получения человеческих рекомбинантных антител из единичных клеток часто используют протокол, описанный K. Smith и соавт. [10] (см. рис. S1b Дополнительных материалов). Лизис клеток и выход мРНК в реакционную смесь происходит вследствие гипотонического свойства буфера для сортировки клеток с последующей однократной заморозкой–оттаиванием клеток в этом же буфере. Далее с лизатом единичной клетки в качестве источника мРНК проводят реакцию обратной транскрипции с последующей первой мультиплексной ПЦР в той же пробирке с использованием набора OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Германия). В реакцию добавляют смесь внешних 3'- и 5'-генспецифичных праймеров для проведения первой ПЦР. Праймеры группы 5' предназначены для спаривания с участком сигнальной последовательности (справедливо для праймеров 5' L V κ , где L – легкая цепь, V κ – переменный домен κ) либо с местом сочленения сигнальной последовательности и FR1 (справедливо для праймеров 5' L-VH и 5' L V λ , где V λ – переменный домен λ). Праймеры группы 3' комплементарны кДНК константных доменов тяжелой цепи типа γ и μ и легкой цепи κ и λ изомеров (С κ и С λ соответственно). Сначала они служат затравкой для синтеза первой цепи кДНК, а затем участвуют в мультиплексной амплификации кДНК. По завершении первой ПЦР выполняют вторую, которую, в свою очередь, проводят в отдельных пробирках для каждого типа тяжелой

цепи и легкой цепи. В ней задействуют праймеры, отжигающиеся внутри полученных ПЦР-продуктов и содержащие некомплементарные матрицы свесы (оверхенги) с сайтами рестрикции. Полученные продукты амплификации клонируют в векторы, предоставляющие сигнальную последовательность и недостающие константные участки соответствующих цепей иммуноглобулина и предназначенные для экспрессии легкой и тяжелой цепи IgG1 в эукариотической системе.

Позднее F. Rudkin и соавт. [11] представили разработанный ими протокол получения рекомбинантных антител из единичных клеток (см. рис. S1c Дополнительных материалов). Согласно их методике, для синтеза первой цепи кДНК используют олиго(dT)₂₀. Далее следует первый этап вложенной ПЦР, где используют 5'-праймеры, аналогичные тем, которые описаны у K. Smith и соавт. [10], а 3'-праймеры заменяют на авторские: два олигонуклеотида к кодирующей области СН1-домена тяжелой цепи γ и по три праймера к терминальным областям кДНК легких цепей каждого типа (участку нескольких последних кодонов константного домена и двум участкам, синтезированным на матрице 3'-нетранслируемого региона (3' UTR) мРНК). Использование нескольких 3'-праймеров, вероятно, применено для усиления амплификации. Перечень праймеров для второго этапа ПЦР существенно расширен и доработан по сравнению с описанными K. Smith и др. [10] — для охвата большего количества V-генных сегментов. В результате легкие цепи амплифицируют полноразмерными, а внутри тяжелой цепи амплифицируют только домен VH. Дополнительной особенностью этого протокола является отказ от использования рестриктаз в пользу клонирования In-Fusion®, что влечет за собой дополнение каждого праймера большим оверхенгом по 14 нуклеотидов. Суммарно в методе задействовано 104 праймера (4 119 н.).

Альтернативный способ предложен T. Ozawa и др. [12]. Авторами разработана стратегия амплификации кДНК иммуноглобулинов с тяжелой цепью γ и μ и легкой цепью κ и λ из единичных В-клеток с помощью 5'-RACE-метода. Сначала проводят затравку синтеза первых цепей кДНК четырьмя генспецифичными праймерами в реакции обратной транскрипции. Затем применяют ферментативное наращивание гомополимерной нуклеотидной последовательности на 3'-конце, с которой впоследствии гибридизуется праймер с комплементарным гомополимерным участком и адаптерной последовательностью. Эта адаптерная последовательность в дальнейшем служит местом последовательного отжига двух 5'-праймеров: внутреннего и внешнего, — задействованных в первой и второй стадиях вложенной ПЦР. Также используют по два 3'-праймера (аналогично: один внешний, другой внутренний) к

каждому константному участку легкой цепи κ и λ и тяжелой цепи γ и μ . Схема протокола представлена на рис. S1d Дополнительных материалов. Таким образом, при полном отказе от праймеров, комплементарных генным сегментам V и J, авторам удалось амплифицировать пару VH/VL из более 50% В-клеток.

Метод SMART [13, 14] так же, как и 5' RACE, применим в отношении амплификации кДНК единичных иммуноглобулинпродуцирующих клеток. Например, SMART используют для NGS полноразмерных кДНК из единичных клеток, в частности с использованием микрофлюидной изоляции [15, 16]. А значит, его можно использовать для амплификации 5'-концов целевых кДНК, где закодирована последовательность V-доменов. Но из-за включения 5' UTR в состав амплифицируемой последовательности невозможно создать рекомбинантные плазмиды для продукции иммуноглобулина путем клонирования первично полученных ампликонов — для этого потребуются последующая ПЦР с гибридизацией 5'-праймера в начале V-домена и 3'-праймера в конце V-домена или ниже по ходу транскрипции (область константной части). В проведенном нами исследовании такая возможность продемонстрирована. Предлагаемый способ амплификации кДНК схематично представлен на рис. S1e Дополнительных материалов.

Цель данной работы — предложить новый протокол получения рекомбинантных антител из единичных В-лимфоцитов, в котором используют минимальное число синтетических праймеров; при этом функциональную активность антител можно проверить перед клонированием кДНК V-доменов в плазмиды. Способ может быть особенно востребован при работе с несколькими десятками и сотнями иммуноглобулинпродуцирующих клеток, в том числе с неуточненной специфичностью в цитометрическом анализе, например с плазмобластами.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Сортинг единичных В-клеток

В качестве источника В-клеток использовали 40 мл периферической крови человека (информированное добровольное согласие донора получено). Сначала из крови выделяли В-лимфоцитарную фракцию с использованием набора RosetteSep Human B Cell Enrichment Cocktail (STEMCELL, США). Для выявления целевой субпопуляции В-клеток использовали многоцветную панель: CD19 APC/CD27 BV515/CD38 PE-Cy7/IgG BV700. Иммунофенотипирование и сортирование клеток проводили на проточном цитофлуориметре FACS Aria III (BD Biosciences, США), оснащенном тремя лазерами с длинами волн излучения 405, 488 и 633 нм. Данная панель позволила выделить IgG⁺ В-клетки с феноти-

Таблица 1. Режим проведения ОТ-ПЦР с использованием набора SMART-Seq HT
Table 1. RT-PCR protocol using the SMART-Seq HT kit

Стадия	Температура блока, °С	Продолжительность	Цикличность
Подготовка к обратной транскрипции: “горячий” лизис клетки, инактивация ферментов, денатурация вторичной структуры мРНК и праймера	72	3 мин	1×
	4	5 мин	
Обратная транскрипция	42	90 мин	1×
Предварительная денатурация перед ПЦР	95	1 мин	1×
Циклическая амплификация	98	10 с	20×
	65	30 с	
	68	3 мин	
Финальная элонгация	72	10 мин	1×
Выемка образцов	4	∞	1×

пом CD19⁺CD27⁺CD38^{+/-}IgG⁺. Клетки этого фенотипа сортировали по одной в крышки к пробиркам для разведения (Part #1702-00; SSI Bio, США), куда предварительно вносили 12.5 мкл лизирующего буфера для улавливания клеток. Буфер готовили из компонентов коммерческого набора SMART-Seq HT (Takara Bio, Япония), исходя из количества каждого компонента на 1 лунку: 10.5 мкл воды Nuclease-Free Water, 0.95 мкл 10× Lysis Buffer, 0.95 мкл RNase Inhibitor, 1 мкл 10 мкМ раствора олигонуклеотида 3' SMART-Seq CDS Primer II A (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCA-GAGTACT₍₂₀₎VN-3'). Крышки с буфером вставляли в лунки 96-луночного планшета для культивирования клеточных культур и немедленно использовали для сортировки. После сортировки емкости закрывали крышками для стрипов (Part #3105-00; SSI Bio) и помещали на -80°C.

Обратная транскрипция, совмещенная с амплификацией (ОТ-ПЦР) транскрипта В-клеток

Синтез κДНК проводили с использованием компонентов набора SMART-Seq HT (Takara Bio), в том числе праймера 3' SMART-Seq CDS Primer II A, комплементарного поли(А)-хвосту мРНК. Емкости с единичными клетками размораживали, содержимое каждой крышки переносили в отдельные 0.2-миллилитровые пробирки для ПЦР, помещали в амплификатор с разогретой до 105°C крышкой и прогревали до 72°C в течение 3 мин, после чего температуру в амплификаторе понижали до 4°C и инкубировали еще 2 мин. Затем, не извлекая пробирки из амплификатора, вносили в каждую по 12.5 мкл реакционной смеси следующего состава: вода (Nuclease-Free Water) – 0.7 мкл, One-Step Buffer – 8 мкл, SMART-Seq HT Oligonucleotide – 1 мкл, RNase Inhibitor – 0.5 мкл, SeqAmp DNA Polymerase – 0.3 мкл, SMARTScribe Reverse

Transcriptase (100 U/μL) – 2 мкл. Содержимое пробирки аккуратно перемешивали пипетированием (2–3 раза), избегая образования пузырей. Запускали работу амплификатора с параметрами, представленными в табл. 1.

Дизайн генспецифичных праймеров для амплификации κДНК

Информацию о функциональных аллелях, которые могут кодировать иммуноглобулин, получали из базы генов и аллелей зародышевых линий IMGT/GENE-DB (IMGT – ImMunoGeneTics information system; <https://www.imgt.org/genedb/>). Для выгрузки последовательностей использовали перечисленные далее параметры. Species: *Homo sapiens*; Molecular component: *IG*; Functionality: *functional*; Gene type: *variable* и *constant* для 3' JH-CHG, *constant* для 3' Cκ и 3' Cλ; Locus: *IGH* для 5' VH и 3' JH-CHG, *IGK* для 5' Vκ и 3' Cκ, *IGL* для 5' VL и 3' Cλ; Остальное: по умолчанию (*any*). Комплементарные участки праймеров для амплификации областей интереса определяли вручную, исходя из общих принципов дизайна праймеров (длина – от 18 нуклеотидов, температура плавления – от 50°C при 50 мМ Na⁺). В некоторых случаях сознательно внедряли некомплементарные основания (мисматчи) для сокращения общего числа праймеров, но одновременно стремились к минимизации мисматчей.

Амплификация полинуклеотидов, которые кодируют домены VH и Vκ или VL цепей иммуноглобулина

Для каждой реакции ОТ-ПЦР проводили три ПЦР с образцом κДНК в качестве матрицы: одна для амплификации VH всех подклассов IgG, одна для Vκ и одна для VL. Для ПЦР использовали реакционные смеси, приготовленные на основе дву-

Таблица 2. Праймеры для амплификации кДНК, содержащих нуклеотидные последовательности переменных участков иммуноглобулина человека. Набор для создания линейных экспрессионных кассет IgG с помощью SOE-PCR

Table 2. Primers for the amplification of cDNA containing the coding sequence of variable region of the human immunoglobulin. Set for generation of linear expression cassettes of IgG via SOE-PCR

№, п/п	Композиция	Праймер		
		название	последовательность, 5' → 3'	длина
1	VH-CHG (SOE)	5' VH-1	GGGGCGTCCAGTGTGAGGTACCTTGARGGAGT	33
2		5' VH-2	GGGGCGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGCACT	33
3		5' VH-3	GGGGCGTCCAGTGTGARGTGCADCTGGTGGAGTC	34
4		5' VH-4	GGGGCGTCCAGTGTGAGGTSCAGCTGGTGCAAT	33
5		5' VH-5	GGGGCGTCCAGTGTGAGSTGCAGCTGCAGGAGT	33
6		5' VH-6	GGGGCGTCCAGTGTGAGRTGCAGCTGGTGSAGT	33
7		5' VH-7	GGGGCGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGTTGGAGT	33
8		5' VH-8	GGGGCGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTKGTGCAGT	33
9		5' VH-9	GGGGCGTCCAGTGTGAGGTRCAGCTRCAGSAGT	33
10		3' JH-CHG	GCCCTTGTTGAGGCTGAGGAGAC	24
11	Vκ-Сκ (SOE)	5' Vκ-1	GAGCGGCGCAAGGTGCGAWATTGTGATGACDCAGTCTCCA	40
12		5' Vκ-2	GAGCGGCGCAAGGTGCGABATTGTGATGACCCAG	34
13		5' Vκ-3	GAGCGGCGCAAGGTGCGMCATCCRGWTGACCCAGT	35
14		5' Vκ-4	GAGCGGCGCAAGGTGCGAAACGACACTCACGCAG	34
15		3' Сκ	GGGCGTTGTCAACCTTCCACTGTAC	25
16	Vλ-Сλ (SOE)	5' Vλ-1	GAGCGGCGCAAGGTGCCAGCYTGTGCTGACTCAAT	35
17		5' Vλ-2	GAGCGGCGCAAGGTGCTCCTATGWGCTGACTCAG	34
18		5' Vλ-3	GAGCGGCGCAAGGTGCTCCTATGAGCTGACACAG	34
19		5' Vλ-4	GAGCGGCGCAAGGTGCCAGTCTGCCCTGACTCAG	34
20		5' Vλ-5	GAGCGGCGCAAGGTGCCAGTCTGTGBTGACGCAGC	35
21		5' Vλ-6	GAGCGGCGCAAGGTGCCWGSCTGTGCTGACTCAG	34
22		5' Vλ-7	GAGCGGCGCAAGGTGCCAGGCAGGGCTGACTCAG	34
23		5' Vλ-8	GAGCGGCGCAAGGTGCCAGRCTGTGGTGACYCAG	34
24		5' Vλ-9	GAGCGGCGCAAGGTGCAATTTATGCTGACTCAGC	35
25		3' Сλ	GTGGCCTTGTTAGCTTGAAGCTCC	24

кратной смеси dNTPs и полимеразы Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, США), а также композиции праймеров. Для приготовления стоковых 25-кратных растворов праймеров (композиций) смешивали праймеры, представленные в табл. 2, согласно приведенному ниже перечню таким образом, чтобы конечная концентрация каждого олигонуклеотида составила 5 мкМ.

1) Композиция VH-CHG (SOE): праймеры 5' VH-1, 5' VH-2, 5' VH-3, 5' VH-4, 5' VH-5, 5' VH-6, 5' VH-7, 5' VH-8, 5' VH-9, 3' JH-CHG (комплементарен области, кодирующей стык J-генного сег-

мента и константного (constant, C) домена тяжелой (heavy, H) цепи иммуноглобулина G).

2) Композиция Vκ-Сκ (SOE): 5' Vκ-1, 5' Vκ-2, 5' Vκ-3, 5' Vκ-4, 3' Сκ.

3) Композиция Vλ-Сλ (SOE): 5' Vλ-1, 5' Vλ-2, 5' Vλ-3, 5' Vλ-4, 5' Vλ-5, 5' Vλ-6, 5' Vλ-7, 5' Vλ-8, 5' Vλ-9, 3' Сλ.

Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 12.5 мкл Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix, 1 мкл раствора праймеров, 0.5 мкл образца кДНК и 11 мкл воды (nuclease-free). Реакцию ПЦР проводили при 98°C в течение 1 мин (начальная денатурация и запуск горячего стар-

та), затем 35 циклов при 98°C в течение 10 с (денатурация), 50°C для VH или 55°C для Vk и VL в течение 10 с (отжиг) и 72°C в течение 30 с (элонгация). Заключительная элонгация длилась 1 мин при 72°C.

Аликвоты каждого продукта ПЦР объемом 2 мкл анализировали с помощью электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле. Корректно прошедшие реакции отмечали, если они представляли собой монопродукт и имели следующую длину в сравнении с маркером молекулярной массы: VH 390–420 п.н., Vk 470–490 п.н., VL 410–430 п.н. Чистая дорожка или наличие нескольких слабо различимых полос другой длины считали за непрошедшую реакцию. Продукты реакций, интерпретированных как успешно прошедшие, очищали от полимераза с использованием микроцентрифужных колонок QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen).

Получения линейных экспрессионных кассет IgG

Продукты ПЦР далее использовали для сборки экспрессионно активного гена соответствующей цепи иммуноглобулина при помощи SOE-PCR. Так, к 5'-области полинуклеотида варибельного региона присоединяли последовательность энхансера/промотора предраннего гена-1 цитомегаловируса человека и последовательность сигнального пептида, где старт-кодон находится в контекстном окружении последовательности Козак. Эти фрагменты получали в ПЦР путем амплификации энхансер-промоторной области плазмиды pCDNA3.4 (Invitrogen, США), внедрив кодирующую последовательность сигнального пептида в структуру обратного праймера. К 3'-области добавляли недостающую (не затронутую в процессе амплификации) часть нуклеотидной последовательности константного региона цепи и сигнал полиаденилирования SV40L. Эти фрагменты получали в ПЦР путем амплификации участков плазмид pSF-CMV-HuIgG1 HC, pSF-CMV-HuKappa LC и pSF-CMV-HuLambda LC из набора Human IgG Vector Set (PP2409; Oxford Genetics, Великобритания). Результирующая SOE-PCR соединяла три полинуклеотида в единую линейную экспрессионную кассету. Принципиальная схема получения кассет изображена на рис. 1. Праймеры, необходимые для данной процедуры, перечислены в табл. 3 и продублированы в расширенной табл. S1 (Дополнительные материалы). Реакции №№ 3, 4, 5 в табл. 3 относятся к собственно SOE-PCR и формируют линейные экспрессионные кассеты тяжелой цепи γ1, легкой цепи изотипа κ и легкой цепи изотипа λ соответственно.

Клонирование открытых рамок считывания цепей иммуноглобулинов в плазмидные векторы

Каждую отдельную линейную экспрессионную кассету обрабатывали рестриктазами *NcoI* и *NheI* (Thermo Fisher Scientific) и клонировали по тем же сайтам в плазмиду pSF-CMV-HuIgG1 HC. Очищенные плазмиды секвенировали по Сэнгеру с праймера CMV Forward (5' CGCAAATGGGCG-GTAGGCGTG 3').

Анализ полученных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, аннотирование региона V(D)J-рекомбинации

Прочтенные нуклеотидные последовательности анализировали с помощью автоматизированного компьютерного алгоритма IMGT/V-QUEST (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/input) для подтверждения их принадлежности к кодирующим последовательностям цепей человеческих антител. Алгоритм определяет степень гомологии последовательности, прошедшей V(D)J-рекомбинацию, с расшифрованными V-, D- и J-генными сегментами зародышевой линии человека.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами разработан способ получения рекомбинантных антител из единичных В-клеток, который изложен в патенте на изобретение RU2775914C1 [17]. Его сущность заключается в проведении обратной транскрипции мРНК единичного лимфоцита по технологии SMART, двухстадийной амплификации пары полинуклеотидов VH/VL и клонировании ампликонов в экспрессионные плазмиды PP2409 (Oxford Genetics). Согласно разработанному протоколу, для затравки синтеза первой цепи κДНК используют композицию генспецифичных праймеров с дополнительной адаптерной последовательностью к цепям типа γ, ε, α, μ, κ и λ (группа олигонуклеотидов под названием 3' HuIgSMART). В результате после первой амплификации κДНК получают обогащенную смесь из полинуклеотидов, кодирующих только фрагменты цепей иммуноглобулина. В процессе дальнейшего развития протокола нами установлено, что второй этап ПЦР может быть выполнен более эффективно, если материалом служит тотально амплифицированная κДНК. Именно поэтому генспецифичные праймеры группы 3' HuIgSMART теперь заменены на один праймер 3' SMART-Seq CDS Primer II A – заякоренный олиго(dT)₂₀ с адаптерной последовательностью. Праймеры для амплификации кодирующих VH и VL участков (табл. 2) незначительно отличаются от аналогичных, предложенных нами в патентной заявке. В частности, к праймерам группы 5' добавлены некомплементарные нуклеотидные последовательности, выступающие в роли перекрывающихся

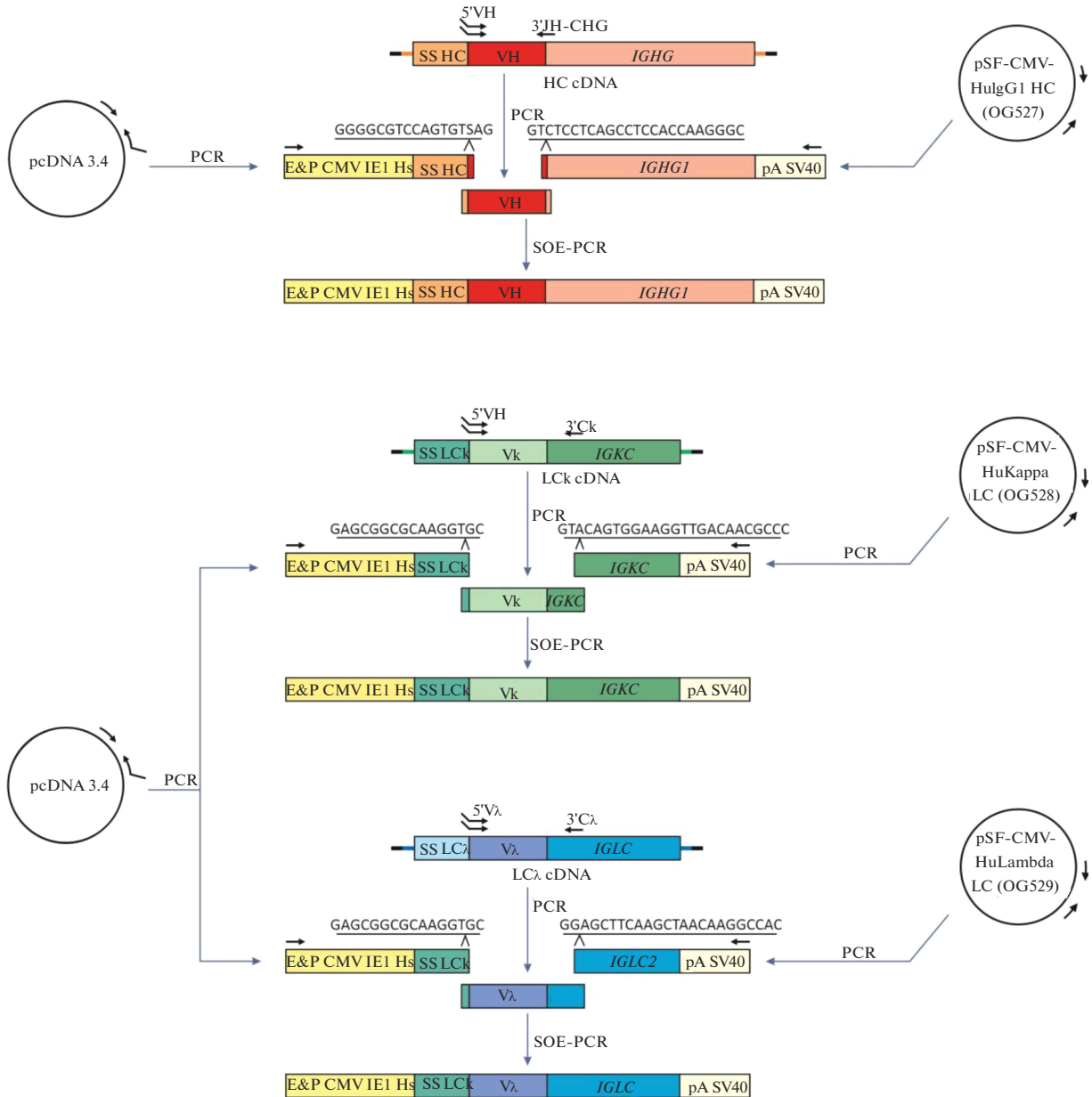


Рис. 1. Схема получения линейных экспрессионных кассет цепей иммуноглобулина в процессе SOE-PCR. Используются следующие обозначения: cDNA – кДНК; E&P CMV IE1 Hs – энхансер и промотор предраннего гена-1 цитомегаловируса человека; LC – легкая цепь; SS HC – последовательность, кодирующая сигнальный пептид тяжелой цепи; SS LCK – последовательность, кодирующая сигнальный пептид легкой цепи изотипа κ; SS LCL – последовательность, кодирующая сигнальный пептид легкой цепи изотипа λ; *IGHG1* – ген константного региона тяжелой цепи γ1; *IGKC* – ген константного региона легкой цепи κ; *IGLC* – ген константного региона легкой цепи λ; pA SV40 – сигнал полиаденилирования SV40.

Fig. 1. Scheme for obtaining linear expression cassettes of immunoglobulin chains via SOE-PCR. The following designations are used: E&P CMV IE1 Hs – enhancer and promoter of the human cytomegalovirus immediate early gene 1; LC – light chain; SS HC – coding sequence of heavy chain signal peptide; SS LCK – coding sequence of κ isotype light chain signal peptide; SS LCL – coding sequence of λ isotype light chain signal peptide; *IGHG1* – immunoglobulin heavy constant gamma 1 gene; *IGKC* – immunoglobulin kappa constant gene; *IGLC* – immunoglobulin lambda constant gene; pA SV40 – polyadenylation signal SV40.

(гомологичных) участков в SOE-PCR. К праймерам 5'-VH добавили последовательность GGGGCGTCCAGTGT; к праймерам 5'-Vκ и 5'-Vλ – последовательность GAGCGGCGCAAGGTGC. Соединение трех полинуклеотидов в SOE-PCR формирует

линейную экспрессионную кассету с открытой рамкой считывания, которая кодирует N-концевой сигнальный пептид и собственно цепь антитела. Для тяжелой и легкой цепи мы выбрали сигнальные пептиды H7 (MEFGLSWVFLVALFRGVQC) и

Таблица 3. ПЦР для получения линейных экспрессионных кассет: праймеры, ДНК-матрицы, длина ампликонов
Table 3. PCRs for generation of linear expression cassettes: primers, templates, amplicon lengths

№ ^a	Образец ДНК	Праймер или смесь праймеров		Длина продукта ^b , п.н.
		название	последовательность, 5' → 3'	
1.1	κДНК В-лимфоцита IgG ⁺	См. табл. 2		390–420
1.2	κДНК В-лимфоцита IgG ⁺ с легкой цепью изотипа κ	См. табл. 2		470–490
1.3	κДНК В-лимфоцита с легкой цепью изотипа λ	См. табл. 2		410–430
2.1	pcDNA3.4	ECMV_For	GGCCAGATATACGCCGTTGAC	768
		CMVforH_Rev	CTSACACTGGAGCGCCCTAAAAAGAGCAACGAGGAAACCCAGCTCA GCCCAAACCTCCATGGTGGCGGATCCTCTAGAGTCCGGAGGC	
2.2	pcDNA3.4	ECMV_For	GGCCAGATATACGCCGTTGAC	773
		CMV-forK&L_Rev	GCACCTTGGCCGCTCAGCCACAGGAGCAGGAGTCCAGCAGCTGG GCCGGCAGCTCATGTCCATGGTGGCGATCCTCTAGAGTCCGGAGGC	
2.3	pSF-CMV-HuIgG1 HC	Cg1_For	GTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCTAG	1353
		sv40pA_Rev	ATGCTACGATACCCGATAGAGATGG	
2.4	pSF-CMV-HuKappa_LC	Ck_For	GTACAGTGGAAAGGTTGACAACGGCCC	561
		sv40pA_Rev	ATGCTACGATACCCGATAGAGATGG	
2.5	pSF-CMV-HuLambda_LC	Cl_For	GAGCTTCAAGCTAACCAAGGCCAC	621
		sv40pA_Rev	ATGCTACGATACCCGATAGAGATGG	
3	Смесь продуктов реакций 1.1, 2.1 и 2.3	ECMV_For	GGCCAGATATACGCCGTTGAC	2473–2503
		sv40pA_Rev	ATGCTACGATACCCGATAGAGATGG	
4	Смесь продуктов реакций 1.2, 2.2 и 2.4	ECMV_For	GGCCAGATATACGCCGTTGAC	1763–1783
		sv40pA_Rev	ATGCTACGATACCCGATAGAGATGG	
5	Смесь продуктов реакций 1.3, 2.2 и 2.5	ECMV_For	GGCCAGATATACGCCGTTGAC	1765–1785
		sv40pA_Rev	ATGCTACGATACCCGATAGAGATGG	

Примечание: ^a Номер реакции. ^b Последовательности ПЦР-продуктов см. в табл. S1 Дополнительных материалов.
 Note: ^a The reaction number. ^b For sequences of the PCR products, see Table S1 of the Supplementary materials.

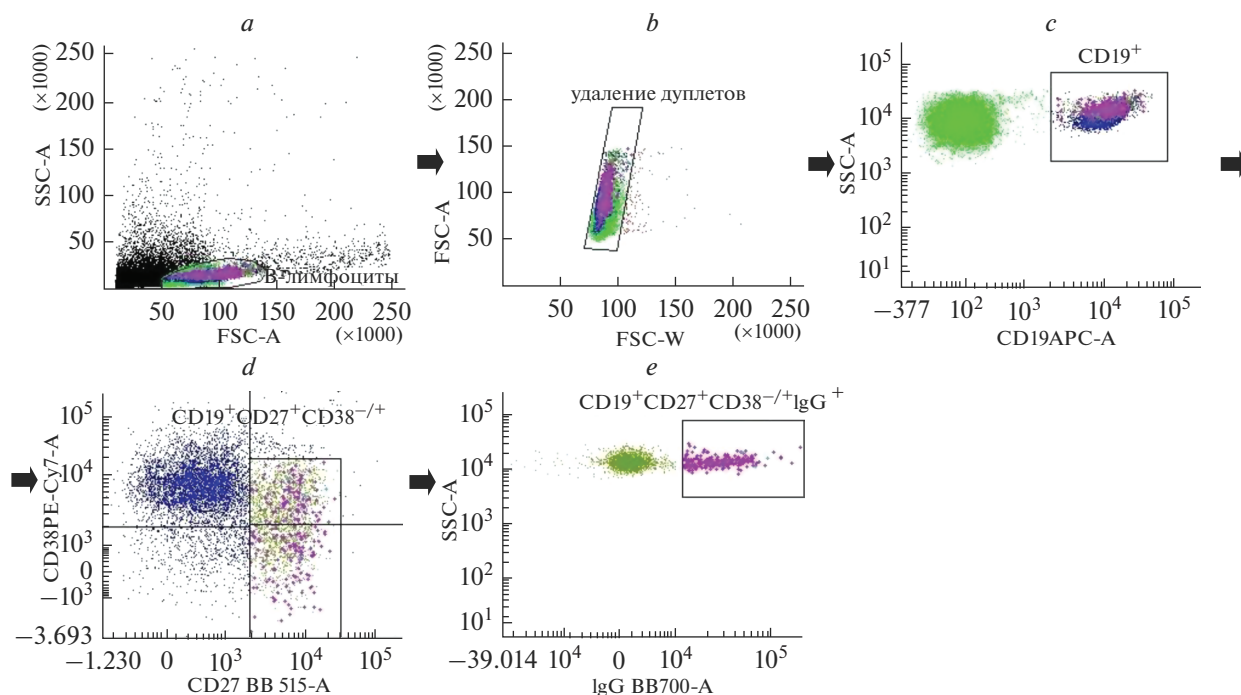


Рис. 2. Стратегия многоэтапного гейтирования субпопуляции В-клеток с применением панели CD19 APC/CD38 PE-Cy7/CD27 BB515/IgG BB700. Сначала проводили гейтирование по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию (a). После исключения дуплетов (b) и гейтирования $CD19^+$ В-лимфоцитов (c) на основе коэкспрессии молекул CD27/CD38 выделяли В-клетки с фенотипом $CD19^+CD27^+CD38^{-/+}$ (d). Далее в этой субпопуляции дополнительно выделяли только IgG^+ В-клетки памяти (e).

Fig. 2. A multi-step gating strategy for B-cell subpopulation using the panel of CD19 APC/CD38 PE-Cy7/CD27 BB515/IgG BB700. First, forward (FSC) and side (SSC) scatter gating was performed (a). After exclusion of doublets (b) and gating of $CD19^+$ B-lymphocytes (c), B-cells with the $CD19^+CD27^+CD38^{-/+}$ phenotype were identified by coexpression of CD27/CD38 molecules (d). Further, IgG^+ memory B-cells were additionally isolated within this subpopulation (e).

L1 (MDMRVPAQLLGLLLLWLSGARC) соответственно, которые были исследованы R. Naryadi и соавт. [18]. Данная комбинация преимущественно позитивно влияет на количественный выход антител при продукции в клетках СНО.

В процессе дизайна 5'-праймеров отдельные гомологичные последовательности удалось преобразовать в консенсусные и записать их с символами вырожденных нуклеотидов ИЮПАК. Тем самым мы сократили число последовательностей для синтеза и добились практически полного соответствия 5'-праймеров всевозможным аллельным вариантам генных сегментов *IGHV*, *IGKV* и *IGLV*: для более чем 96% аллелей внутри каждой группы существует хотя бы один праймер, комплексной матрице полностью или содержащий единственный мисматч. В табл. S2–S4 (Дополнительные материалы) представлены участки отжига 5'-праймеров внутри аллелей V-генных сегментов и ближайшие по гомологии варианты 5'-праймеров, которые получены декодированием вырожденных позиций нуклеотидов (оверхенги не добавлены для удобства восприятия). В табл. S5–S7 (Дополнительные материалы) пред-

ставлены последовательности 3'-праймеров и участки их отжига.

В прикладных исследованиях, связанных с получением рекомбинантных антител из единичных В-клеток человека, чаще всего используют протокол амплификации кДНК, описанный К. Smith и соавт. [10]. Для сравнения композиций праймеров, используемых нами и в указанной работе, мы разместили их согласно предназначению в табл. S8 (Дополнительные материалы). В результате можно сделать следующий вывод: в процессе превращения мРНК IgG единичной клетки в рекомбинантные ДНК, кодирующие легкую и тяжелую цепь, вместо 42 праймеров суммарной протяженностью 1572 нуклеотида, используемых К. Smith и др. [10], мы предлагаем задействовать 28 общей протяженностью 924 нуклеотида

Из 40 мл цельной периферической крови донора было выделено 2.21×10^6 В-лимфоцитов. Обогащенную фракцию В-клеток окрашивали конъюгатами флуорохромов против IgG человека и поверхностных клеточных маркеров. В процессе цитометрического сортирования изолированы В-клетки с фенотипом $CD19^+CD27^+CD38^{-/+}IgG^+$ (рис. 2), что соответствует активированным В-клеткам па-

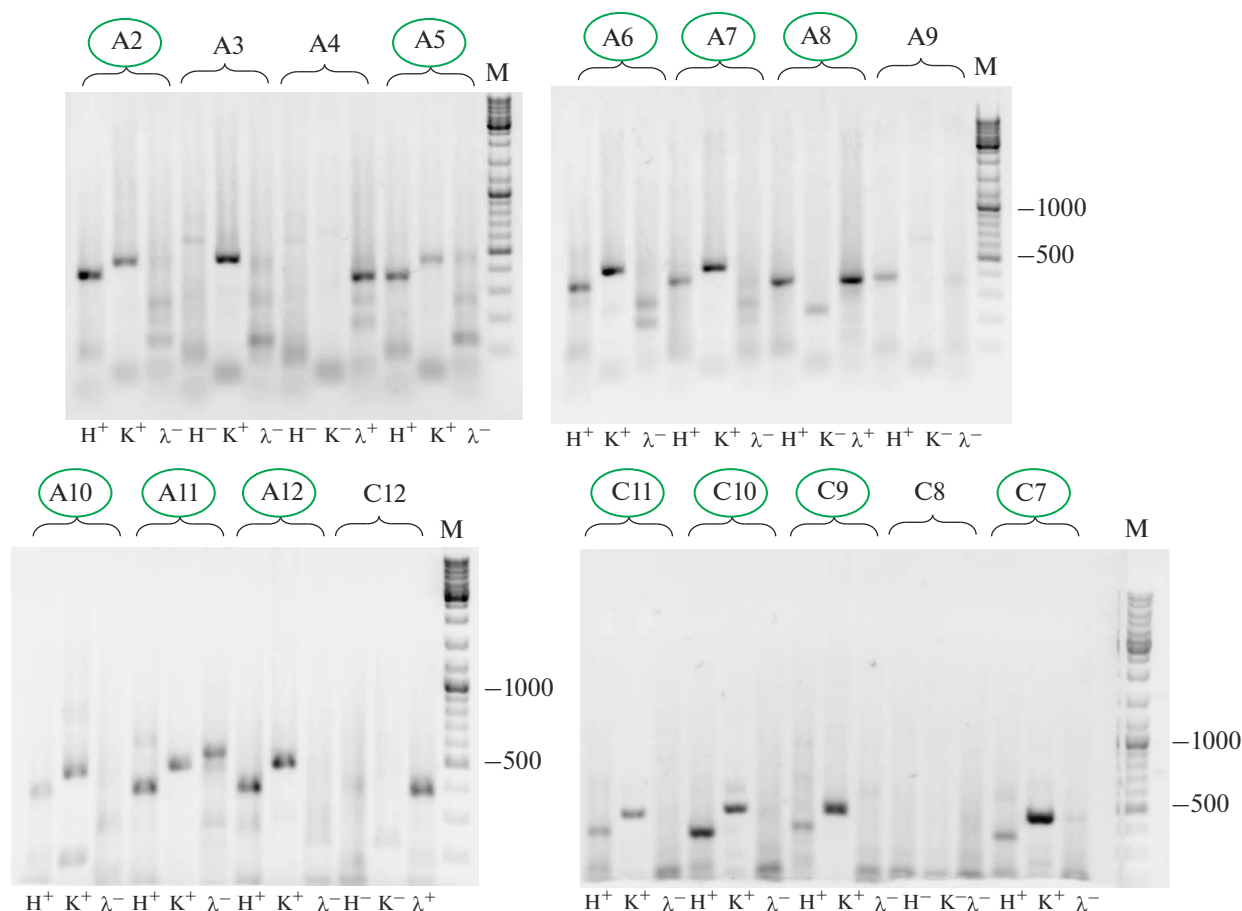


Рис. 3. ПЦР кДНК иммуноглобулинов 17 единичных клеток (слоты А2–С7). На дорожки нанесено по 2 мкл продукта реакции. Фигурной скобкой сверху объединены реакции, в которых использовали кДНК одной клетки (номер слота указан над скобкой) в качестве матрицы. Интерпретация приведена внизу каждой дорожки: “+” – позитивный результат, “–” – негативный результат амплификации. Обведены номера слотов с клетками, из которых получен позитивный результат амплификации кДНК легкой и тяжелой цепи одновременно. М – маркер молекулярной массы ДНК GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific).

Fig. 3. PCRs of cDNA of 17 single cells from slots A2–C7. Lanes were loaded with 2 μl of reaction product. Reactions that used cDNA of a single cell as a template are combined in a group of 3 lanes by curly bracket located from above. The result interpreted below each of the lanes: “+” – positive amplification, “–” – negative amplification. The circled slots indicate positive results of cDNA amplification for both heavy and light chains. M – GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific).

мяти. Единичные клетки помещали в лизирующий буфер для выхода мРНК из клетки в реакционный раствор. Лизирующий буфер разливали не в ПЦР-пробирки, а в перевернутые крышки для пробирок, тем самым существенно увеличив площадь поверхности для “улавливания” клеток. Однако такие емкости необходимо подготавливать за считанные минуты до начала сортировки из-за ускоренного испарения воды из раствора. У нас есть успешней опыт сортировки клеток в низкопрофильные ПЦР-стрипы из антистатического полипропилена (B72811; BIOplastics, Нидерланды), что более удобно для проведения дальнейших исследований, не входящих в рамки этой работы (данные не представлены).

На первой стадии проводили амплификацию кДНК всех транскрибируемых мРНК в тех же

пробирках, где прошла обратная транскрипция. На втором этапе был использован образец кДНК из ПЦР первого этапа. На каждую В-клетку (антитело) проводили по три реакции с композициями генспецифичных праймеров: VH-CHG (SOE), Vκ-Сκ (SOE) и Vλ-Сλ (SOE). В результате были получены полинуклеотиды, кодирующие переменный домен и часть константного домена. На рис. 3 представлен электрофоретический анализ миграции ПЦР-продуктов в агарозном геле. В результате амплификации кДНК антител первых семнадцати В-клеток получены результативные пары полинуклеотидов VH-VL из клеток в слотах А2, А5, А6, А7, А8, А10, А11, А12, С7, С9, С10 и С11, так как оба ампликона были четко различимы и соответствовали ожидаемой длине. В то же время из четырех клеток удалось амплифицировать

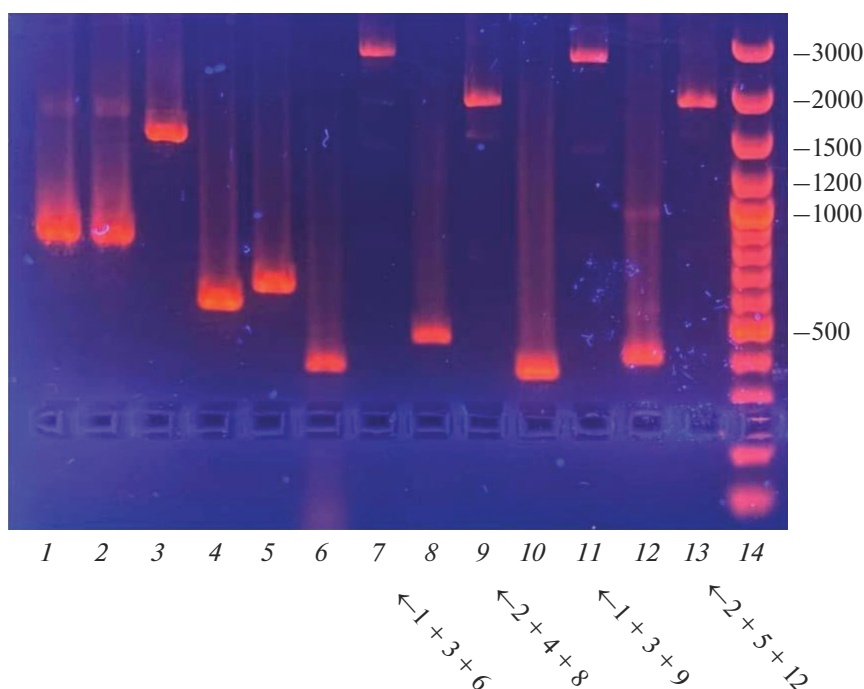


Рис. 4. Результат ПЦР, выполненных для сборки линейных экспрессионных кассет антител А2 и А8. На дорожки нанесено по 2 мкл продукта реакции. 1 – CMV-энхансер/промотор, старт-кодон в контексте Козак-последовательности, сигнальная последовательность тяжелой цепи (соответствует реакции № 2.1 в табл. 3); 2 – CMV-энхансер/промотор, старт-кодон в контексте Козак-последовательности, сигнальная последовательность легкой цепи (соответствует реакции № 2.2 в табл. 3); 3 – константный регион тяжелой цепи $\gamma 1$ и сигнал полиаденилирования SV40 (соответствует реакции № 2.3 в табл. 3); 4 – константный регион легкой цепи изотипа κ и сигнал полиаденилирования SV40 (соответствует реакции № 2.4 в табл. 3); 5 – константный регион легкой цепи изотипа λ и сигнал полиаденилирования SV40 (соответствует реакции № 2.5 в табл. 3); 6 – переменный регион тяжелой цепи антитела А2 (соответствует реакции № 1.1 в табл. 3); 7 – экспрессионная кассета тяжелой цепи антитела А2 (соответствует реакции № 3 в табл. 3); 8 – переменный регион и часть константного региона легкой цепи изотипа κ антитела А2 (соответствует реакции № 1.2 в табл. 3); 9 – экспрессионная кассета легкой цепи антитела А2 (соответствует реакции № 4 в табл. 3); 10 – переменный регион тяжелой цепи антитела А8 (соответствует реакции № 1.1 в табл. 3); 11 – экспрессионная кассета тяжелой цепи антитела А8 (соответствует реакции № 3 в табл. 3); 12 – переменный регион и часть константного региона легкой цепи изотипа λ антитела А8 (соответствует реакции № 1.3 в табл. 3); 13 – экспрессионная кассета легкой цепи антитела А8 (соответствует реакции № 5 в табл. 3); 14 – маркер длин ДНК GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Fig. 4. Result of PCRs performed to assemble linear expression cassettes of antibodies A2 and A8. Lanes were loaded with 2 μ L of reaction product. 1 – CMV enhancer/promoter, start codon in surrounding Kozak sequence context, heavy chain signal sequence (corresponds to reaction no. 2.1 in Table 3); 2 – CMV enhancer/promoter, start codon in surrounding Kozak sequence context, light chain signal sequence (corresponds to reaction no. 2.2 in Table 3); 3 – $\gamma 1$ isotype heavy chain constant region and SV40 polyadenylation signal (corresponds to reaction no. 2.3 in Table 3); 4 – κ isotype light-chain constant region and polyadenylation signal SV40 (corresponds to reaction no. 2.4 in Table 3); 5 – λ isotype light chain constant region and polyadenylation signal SV40 (corresponds to reaction no. 2.5 in Table 3); 6 – A2 antibody variable region of heavy chain (corresponds to reaction no. 1.1 in Table 3); 7 – A2 antibody expression cassette of the heavy chain (corresponds to reaction no. 3 in Table 3); 8 – A2 antibody variable region and fragment of constant region of κ isotype light chain (corresponds to reaction no. 1.2 in Table 3); 9 – A2 antibody expression cassette of light chain (corresponds to reaction no. 4 in Table 3); 10 – A8 antibody variable region of heavy chain (corresponds to reaction no. 1.1 in Table 3); 11 – A8 antibody expression cassette of heavy chain (corresponds to reaction no. 3 in Table 3); 12 – A8 antibody variable region and fragment of constant region of λ isotype light chain (corresponds to reaction no. 1.3 in Table 3); 13 – A8 antibody expression cassette of light chain (corresponds to reaction no. 5 in Table 3); 14 – GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

участки кДНК, кодирующих лишь одну из цепей: А3 (только регион V κ), А4 и С12 (только регион V λ) и А9 (только регион V H). Из клетки С8 не удалось амплифицировать никакой кДНК иммуноглобулина. Процент выполнения успешной ПЦР составил 70%, что соизмеримо с показателями в известных протоколах [7, 10–12].

Для сборки линейных экспрессионных кассет сначала амплифицировали участки коммерчески доступных плазмид согласно табл. 3 (реакции

2.1–2.5), затем проводили SOE-PCR и получали линейные экспрессионные кассеты антител А2, А5, А6, А7 и А8. Рис. 4 отражает результат получения линейных экспрессионных кассет антител А2 и А8 в виде электрофореграммы всех полученных ПЦР-продуктов.

Линейная экспрессионная кассета, по сути, повторяет транскрипционно активную часть плазмиды, то есть состоит из промотора в 5'-области, открытой рамки считывания и сигнала полиадени-

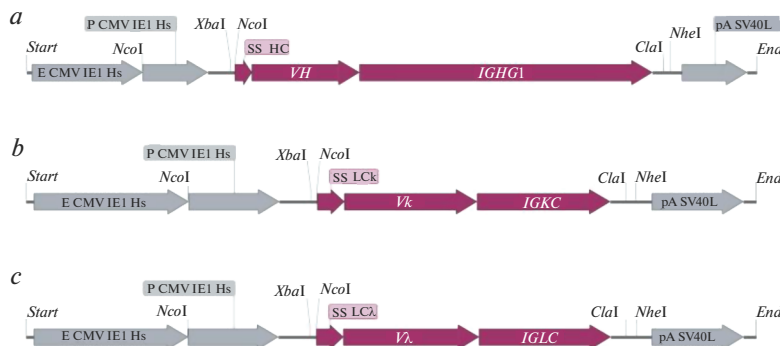


Рис. 5. Карты линейных экспрессионных кассет цепей иммуноглобулина: тяжелой цепи $\gamma 1$ (a), легкой цепи κ (b), легкой цепи λ (c). Используются следующие обозначения: E CMV IE1 Hs – энхансер предраннего гена-1 цитомегаловируса человека; P CMV IE1 Hs – промотор предраннего гена-1 цитомегаловируса человека.
Fig. 5. Maps of linear expression cassettes of immunoglobulin chains: heavy chain $\gamma 1$ (a), light chain κ (b), light chain λ (c). The following designations are used: E CMV IE1 Hs – enhancer of the human cytomegalovirus immediate early gene 1; P CMV IE1 Hs – promoter of the human cytomegalovirus immediate early gene 1.

лирования в 3'-области. Производство такой конструкции занимает ровно столько времени, сколько идет сплайсинговая ПЦР (SOE-PCR). А получение рекомбинантной плазмиды подразумевает минимум двукратную очистку ПЦР-продукта (перед гидролизом и после гидролиза рестриктазами), реакцию лигирования плазмиды и вставки, трансформацию в *Escherichia coli*, скрининг нескольких единичных колоний в ПЦР на предмет корректного клонирования, наращивание культуры и выделение плазмидной ДНК, проверку рамки считывания через секвенирование плазмид по Сэнгеру. Экспрессионные кассеты тяжелой и легкой цепи одного антитела, одновременно трансфицированные в клетки линии HEK293, обеспечивают синтез полноразмерных молекул иммуноглобулина. В целом, трансформация клеток HEK293 линейной ДНК и последующий анализ функциональной активности антител отвечает на вопрос, есть ли вообще необходимость проводить клонирование в плазмиды. Клонирование остается необходимым этапом для завершения цикла работ по получению рекомбинантных антител. Использование линейных экспрессионных кассет нежелательно для масштабной транзientной трансфекции клеток СНО, так как линейная ДНК имеет ряд недостатков перед сверхспирализованной плазмидной ДНК [19]. Кроме того, в таком исполнении – без использования селективных маркеров и “балластных” фланкирующих последовательностей – они практически непригодны для создания стабильного продуцента. Также их нельзя отсекулировать по Сэнгеру из-за особенностей сплайсинговой ПЦР: наличие неверных вариантов сплайсинга фрагментов ДНК среди продуктов реакции будет выражаться в перекрывающихся пиках на хроматограмме.

Обработка линейных экспрессионных кассет рестриктазами *NcoI* и *NheI* приводит к потере

промоторного и полиаденилирующего сегмента, но оставляет открытую рамку считывания полноразмерной цепи иммуноглобулина, готовую к лигированию в любую из плазмид набора Human IgG Vector Set (рис. 5). Тогда рамка считывания заново приобретает промотор CMV и сигнал полиаденилирования плазмиды. В то же время предусмотрены альтернативные варианты гидролиза по сайтам рестрикции *XbaI*, *NheI* и *XbaI* и *ClaI*. Это делает возможным клонирование открытой рамки считывания в другие векторы, например в плазмиду pcDNA3.1 (Invitrogen), обработанную ферментами *NheI* или *NheI* и *XbaI*, с обязательной проверкой ориентации вставки. Сайты рестрикции *NcoI*, *XbaI*, *ClaI* и *NheI* относятся к редко встречающимся в V-, D-, J-генных сегментах иммуноглобулина зародышевой линии человека (по данным каталога V BASE: <https://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/restriction2.php>), значит вероятность их наличия в кодирующей последовательности цепей минимальна.

Открытые рамки считывания цепей антител A2, A5, A6, A7 и A8 были клонированы из линейных экспрессионных кассет в плазмиду pSF-CMV-HuIgG1 HC. Получено 10 новых плазмид, обеспечивающих синтез данных антител в клетках млекопитающих. Участки рекомбинантных плазмид были секвенированы по Сэнгеру для анализа корректной встройки ДНК. Нуклеотидные последовательности проанализированы с помощью IMGT/V-QUEST. Результат представлен в табл. S9 и на рис. S2 (Дополнительные материалы). В каждой нуклеотидной последовательности алгоритм определил регион V(D)J-рекомбинации, что указывает на принадлежность к полинуклеотидам, кодирующим переменный домен цепи иммуноглобулина человека.

К сожалению, для примера связывания антигена с антителом мы не смогли использовать ма-

териал, полученный после амплификации кДНК V-доменов иммуноглобулина сортированных единичных клеток в рамках данной работы, поскольку провели сортировку В-клеток здорового донора без окрашивания флуоресцентным антигенным зондом. Однако, по результатам проведенных нами модельных экспериментов, созданные по описанному способу линейные экспрессионные кассеты антител с константой диссоциации порядка 10^{-9} М, введенные в клетки НЕК293, через 48 ч обеспечивают синтез антител в таком количестве, при котором они могут быть обнаружены в иммуноферментном анализе при разведении культуральной жидкости не менее чем в 16 раз. Для того, чтобы подтвердить заявленное в цели работы утверждение о проверке функциональной активности антител перед клонированием кДНК V-доменов в плазмиды, мы провели дополнительный эксперимент (см. Дополнительный эксперимент в Дополнительных материалах). Для обратной транскрипции вместо лизата единичного В-лимфоцита использовали изолированную РНК гибридомы Hu-C6D7-RBD, производящей одноименные человеческие антитела к рецепторсвязывающему домену (RBD) белка шипа коронавируса-2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2, штамм Wuhan-Hu-1), которая охарактеризована нами в работе [20] и патенте на изобретение [21]. В остальном процесс получения линейных экспрессионных кассет остался идентичным описанному в разделе “Условия эксперимента”.

В представленной работе мы предложили материалы и методы, которые способствовали успешной амплификации кДНК антител, производимых единичными клетками. Наш протокол может быть выбран в качестве основного для решения данной задачи другими исследователями. В конце отметим несколько моментов, которые помогут выбрать направление для усовершенствования протокола и перспективы его практического применения.

К критически важному этапу мы относим использование набора SMART-Seq HT (Takara Bio). Его применение гарантирует синтез и обогащение кДНК единичных клеток по принципу “все реакции в одной пробирке”, что также практически исключает риски контаминации загрязненными реактивами и кросс-контаминации соседними образцами РНК/кДНК. Следовательно, для повышения эффективности амплификации кДНК антител оптимизации подлежит только стадия ПЦР с генспецифичными праймерами. Оптимизация может включать использование термостабильной полимеразы более высокого или более низкого класса, чем предложенная нами Phusion Hot Start II (например, Q5-полимеразы фирмы NEB или Taq-полимеразы), изменение концентрации ионов Mg^{2+} в буфере, программы амплификатора и т.д. Мы предполагаем, что таким образом

можно добиться парной амплификации V-доменов как минимум для 9 В-клеток из 10.

В то же время стоимость амплификации транскрипта одной клетки с помощью набора SMART-Seq HT достаточно высокая и составляет минимум 60 € (в зависимости от страны приобретения набора). Ее можно снизить на треть путем уменьшения количества каждого компонента в 3 раза. Пока мы не нашли аналогичных реактивов для проведения обратной транскрипции РНК единичной клетки по технологии SMART с последующей амплификацией кДНК, причем с предусмотренным лизисом клетки в реакционном буфере.

Амплификация кДНК антител имеет практическую значимость для создания терапевтических препаратов на основе моноклональных антител человека. При наличии отработанной стратегии цитометрического сортировки перспективных В-лимфоцитов, производящих антитела желаемой специфичности, и возможности применения разработанного нами протокола амплификации кДНК с промежуточной проверкой специфичности антител через линейные экспрессионные кассеты процесс создания терапевтических антител из единичных клеток может получить распространение в научно-исследовательских лабораториях биомедицинской направленности.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках соглашения о предоставлении субсидий 31 октября 2019 года № 075-15-2019-1671.

ЭТИЧЕСКИЕ НОРМЫ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическими стандартами институционального и национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям. От участников исследования было получено информированное добровольное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МАТЕРИАЛ

Электронная версия статьи содержит дополнительный материал, доступный безвозмездно на сайте журнала <https://sciencejournals.ru/journal/biotech/>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pedrioli A., Oxenius A. Single B cell technologies for monoclonal antibody discovery. Trends Immunol.,*

- 2021, 42(12), 1143–1158.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2021.10.008>
2. Pan Y., Cao W., Mu Y., Zhu Q. Microfluidics facilitates the development of single-cell RNA sequencing. *Biosensors*, 2022, 12(7), 450.
<https://doi.org/10.3390/bios12070450>
 3. Gérard A., Woolfe A., Mottet G., Reichen M., Castrillon C., Menrath V., Ellouze S., Poitou A., Doineau R., Briseno-Roa L., Canales-Herrerias P., Mary P., Rose G., Ortega C., Delincé M., Essono S., Jia B., Iannascoli B., Richard-Le Goff, O., Kumar R., Stewart S.N., Pousse Y., Shen B., Gosselin K., Saudemont B., Sautel-Caillé A., Godina A., McNamara S., Eyer K., Millot G.A., Baudry J., England P., Nizak C., Jensen A., Griffiths A.D., Bruhns P., Brennan C. High-throughput single-cell activity-based screening and sequencing of antibodies using droplet microfluidics. *Nat. Biotechnol.*, 2020, 38(6), 715–721.
<https://doi.org/10.1038/s41587-020-0466-7>
 4. Liu L., Wang P., Nair M.S., Yu J., Rapp M., Wang Q., Luo Y., Chan J. F., Sahi V., Figueroa A., Guo X. V., Cerutti G., Bimela J., Gorman J., Zhou T., Chen Z., Yuen K.Y., Kwong P.D., Sodroski J. G., Yin M.T., Sheng Z., Huang Y., Shapiro L., Ho D.D. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature*, 2020, 584(7821), 450–456.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2571-7>
 5. Verma R., Boleti E., George A.J. Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *J. Immunol. Methods*, 1998, 216(1–2), 165–181.
[https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(98\)00077-5](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(98)00077-5)
 6. Liao H.X., Levesque M.C., Nagel A., Dixon A., Zhang R., Walter E., Parks R., Whitesides J., Marshall D.J., Hwang K.K., Yang Y., Chen X., Gao F., Munshaw S., Kepler T.B., Denny T., Moody M.A., Haynes B.F. High-throughput isolation of immunoglobulin genes from single human B cells and expression as monoclonal antibodies. *J. Virol. Methods*, 2009, 158(1–2), 171–179.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.02.014>
 7. Coronella J.A., Telleman P., Truong T.D., Ylera F., Jung-hans R.P. Amplification of IgG VH and VL (Fab) from single human plasma cells and B cells. *Nucleic Acids Res.*, 2000, 28(20), E85.
<https://doi.org/10.1093/nar/28.20.e85>
 8. Sblattero D., Bradbury A. A definitive set of oligonucleotide primers for amplifying human V regions. *Immunotechnology*, 1998, 3(4), 271–278.
[https://doi.org/10.1016/s1380-2933\(97\)10004-5](https://doi.org/10.1016/s1380-2933(97)10004-5)
 9. Burton D.R., Barbas C.F. 3rd. Human antibodies from combinatorial libraries. *Adv. Immunol.*, 1994, 57, 191–280.
[https://doi.org/10.1016/s0065-2776\(08\)60674-4](https://doi.org/10.1016/s0065-2776(08)60674-4)
 10. Smith K., Garman L., Wrammert J., Zheng N.Y., Capra J.D., Ahmed R., Wilson P.C. Rapid generation of fully human monoclonal antibodies specific to a vaccinating antigen. *Nat. Protoc.*, 2009, 4(3), 372–384.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2009.3>
 11. Rudkin F.M., Raziunaite I., Workman H., Essono S., Belmonte R., MacCallum D.M., Johnson E.M., Silva L.M., Palma A.S., Feizi T., Jensen A., Erwig L.P., Gow N.A.R. Single human B cell-derived monoclonal anti-*Candida* antibodies enhance phagocytosis and protect against disseminated candidiasis. *Nat. Commun.*, 2018, 9(1), 5288.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-07738-1>
 12. Ozawa T., Kishi H., Muraguchi A. Amplification and analysis of cDNA generated from a single cell by 5'-RACE: application to isolation of antibody heavy and light chain variable gene sequences from single B cells. *Biotechniques*, 2006, 40(4).
<https://doi.org/10.2144/000112123>
 13. Zhu Y.Y., Chenchik A., Li, R., Hsieh F.Y., Siebert P.D. Construction of cDNA libraries from small quantities of total RNA using template switching catalyzed by M-MLV reverse transcriptase. In: *Genetic Library Construction and Screening*. Germany, Springer, 2002, 69–93.
 14. Zhu Y.Y., Machleder E.M., Chenchik A., Li R., Siebert P.D. Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques*, 2001, 30(4), 892–897.
<https://doi.org/10.2144/01304pf02>
 15. Picelli S., Faridani O.R., Björklund A.K., Winberg G., Sagasser S., Sandberg R. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nat. Protoc.*, 2014, 9(1), 171–181.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2014.006>
 16. DeLaughter D.M. The use of the fluidigm C1 for RNA expression analyses of single cells. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, 2018, 122(1), e55.
<https://doi.org/10.1002/cpmb.55>
 17. Марьян М.А., Фирстова В.В., Шкуратова М.А., Карцева А.С., Силкина М.В., Зенинская Н.А., Рябко А.К., Романенко Я.О., Шемякин И.Г. Способ амплификации нуклеиновых кислот тяжелой и легкой цепи человеческих иммуноглобулинов для создания рекомбинантных антител, композиции праймеров (варианты). Патент RU2775914C1, опублик. 11.07.2022 Бюл. № 20. <https://www1.fips.ru/register-doc-view/fipsServlet?DB=RUPAT&DocNumber=27-75914&TypeFile=html>
 18. Haryadi R., Ho S., Kok Y.J., Pu H. X., Zheng L., Pereira N.A., Li B., Bi X., Goh L.T., Yang Y., Song Z. Optimization of heavy chain and light chain signal peptides for high level expression of therapeutic antibodies in CHO cells. *PLoS One*, 2015, 10(2), e0116878.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116878>
 19. Groll A.V., Levin Y., Barbosa M.C., Ravazzolo A.P. Lipid near DNA low efficiency transfection by liposome can be improved by the use of cationic lipid as charge neutralizer. *Biotechnol. Prog.*, 2006, 22(4), 1220–1224.
<https://doi.org/10.1021/bp060029s>
 20. Романенко Я.О., Марин М.А., Картсева А.С., Силкина М.В., Шкуратова М.А., Макарова М.А., Рябко А.К., Зенинская Н.А., Конышкова Д.А., Шемякин И.Г., Фирстова В.В. Production and characterization of a human monoclonal antibody C6D7-RBD to the RBD domain of the S protein of SARS-CoV-2 virus. *Acta Naturae*, 2023, 15(1), 81–86.
<https://doi.org/10.1021/bp060029s>
 21. Романенко Я.О., Силкина М.В., Карцева А.С., Марьян М.А., Коннышкова Д.А., Макарова М.А., Шкуратова М.А., Шемякин И.Г., Фирстова В.В. Штамм гибридных культивируемых клеток *Homo sapiens/Mus musculus* Hu-C6D7-RBD – продуцент человеческих моноклональных антител, специфичных к RBD домену S белка вируса SARS-CoV-2. Патент RU2788359C1, опублик. 17.01.2023 Бюл. № 2.

Amplification of cDNA of Antibody Variable Domains from Single Human B cells for Obtaining Recombinant Monoclonal Antibodies

**M. A. Marin^{a, #}, N. A. Zeninskaya^a, M. A. Shkuratova^a, M. M. Rogozin^a, A. S. Kartseva^a,
M. V. Silkina^a, Ya. O. Romanenko^a, A. K. Ryabko^a, I. G. Shemyakin^a, and V. V. Firstova^a**

^a*State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотrebnadzor, Obolensk, Moscow oblast, 142279 Russia*

[#]*e-mail: marin@obolensk.org*

Abstract—A method for creating genetic constructs for obtaining recombinant human antibodies from single cells is described. The process starts with isolation of B lymphocytes from human peripheral blood using flow cytometry technique; then the first cDNA strand is synthesized using SMART technology followed by full-transcriptome amplification and amplification of polynucleotides encoding the variable (VH, Vκ and Vλ) domains of immunoglobulin G. For this purpose, we have proposed to use 28 synthetic primers with a total of 924 nucleotides, including additional overhangs at the 5' ends. The primer design makes it possible to construct a pair of linear expression cassettes for the heavy and light chains of each tested antibody from a pair of successfully amplified polynucleotides using splicing PCR. The co-transfection of paired linear expression cassettes into continuous mammalian cell cultures provides the synthesis of a full-length immunoglobulin, the specificity and neutralizing ability of which can be rapidly evaluated in appropriate tests. The open reading frames of the antibody chains can then be cloned into a plasmid vector to create a stable expression cell line.

Keywords: human monoclonal antibodies, recombinant antibodies, cDNA amplification, single cells, linear expression cassettes