

На правах рукописи

ЕЛИСЕЕВ

Игорь Евгеньевич

**Однодоменные антитела ламы  
для блокирования активации рецептора ErbB3:  
разработка, структурно-функциональные исследования,  
перспективы применения в иммунотерапии**

1.5.4 — Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург — 2023

**Работа выполнена** в федеральном государственном бюджетном учреждении высшего образования и науки «Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет имени Ж. И. Алферова Российской академии наук»

**Научный руководитель:**

**ШАМОВА Ольга Валерьевна**, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН.

**Официальные оппоненты:**

**МАРГУЛИС Борис Александрович**, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, главный научный сотрудник;

**ТИЛЛИБ Сергей Владимирович**, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждения науки Институт биологии гена Российской академии наук, заведующий лабораторией молекулярных биотехнологий.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 24.1.158.02 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197022, Санкт-Петербург, Каменноостровский проспект, д. 71.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12 и на сайте:

<https://iemspsb.ru/external/eliseev-igor-evgenevich/>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
кандидат медицинских наук

МУХИН Валерий Николаевич

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Рецепторные тирозинкиназы EGFR и HER2 являются классическими онкогенами, и моноклональные антитела к ним, например цетуксимаб и трастузумаб, давно используются в терапии онкологических заболеваний (*Поляновский и др., 2012; Swain et al., 2023*). Активация данных рецепторов ведет к стимуляции пролиферации клеток и подавлению апоптоза (*Hynes et al., 2009*). Третий представитель семейства рецепторов эпидермального фактора роста, называемый ErbB3 или HER3, образует гетеродимеры с EGFR и HER2 и также участвует в сигнальных путях опухолевых клеток. В частности, пролиферация клеток рака молочной железы с гиперэкспрессией HER2 требует ErbB3, указывая на то, что именно гетеродимер HER2:ErbB3 является мощным онкогенным элементом (*Holbro et al., 2003*). Активация данного гетеродимера задействует как сигнальный путь пролиферации Ras-МАРК, так и антиапоптотический путь PI3K-Akt.

Актуальность исследования обусловлена необходимостью разработки новых иммунотерапевтических подходов для блокирования активации рецептора ErbB3. Важность рецептора ErbB3 как терапевтической мишени связана не только с его участием в процессе опухолевой трансформации, но и с его центральной ролью в развитии резистентности раковых клеток к ингибированию HER2. Блокирование HER2 при помощи ингибиторов тирозинкиназ ведет к увеличению экспрессии ErbB3 и активации антиапоптотического сигнального пути PI3K-Akt, делающего ингибиторы неэффективными (*Sergina et al., 2007*). При этом подавление экспрессии ErbB3 либо его блокирование моноклональным антителом возвращает чувствительность раковых клеток к ингибиторам активности HER2 (*Garrett et al., 2011*). Таким образом, новые моноклональные антитела к внеклеточному домену рецептора ErbB3 могут стать важными терапевтическими инструментами для борьбы с опухолевой резистентностью.

**Степень разработанности темы исследования.** Основной стратегией блокирования активации ErbB3 является создание моноклональных антител к внеклеточному домену рецептора, которые могут заблокировать его в неактивной конформации, помешать связыванию лиганда или димеризации. В настоящее время несколько таких антител находятся в стадии доклинических и клинических исследований. Например, элгемтумаб связывается с субдоменами II и IV внеклеточного домена ErbB3 и блокирует рецептор в неактивной конформации (*Garner et al., 2013*). Лумретузумаб связывается с субдоменом I и препятствует связыванию лиганда (*Mirschberger et al., 2013*). Другое антитело,

КТN3379, взаимодействует с субдоменом III вблизи субдомена II и ингибирует активацию ErbB3 аллостерически, блокируя необходимые для связывания лиганда и димеризации конформационные изменения (*Lee et al., 2015*).

Все приведенные выше разрабатываемые антитела к рецептору ErbB3 являются классическими иммуноглобулинами G. В исследовании предлагается альтернативный подход, заключающийся в применении неканонических антител верблюдовых, которые не имеют легких цепей. Их переменные фрагменты, называемые однодоменными антителами или нанотелами, представляют собой одиночный домен молекулярной массой 12–15 кДа. Однодоменные антитела обладают множеством преимуществ, включая высокую растворимость, стабильность и простоту биотехнологического производства (*Steeland et al., 2016*). Их генетические и структурные особенности порождают необычный антигенный репертуар с широким спектром эпитопов, отличающихся от классических антител. На данный момент блокирование функции рецептора ErbB3 при помощи однодоменных антител продемонстрировано не было.

**Цель и задачи.** Целью представленной работы являлась разработка и структурно-функциональные исследования новых однодоменных антител ламы как перспективных средств для иммунотерапии онкологических заболеваний, основанной на блокировании активации рецептора ErbB3 в опухолевых клетках. Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить закономерности амплификации сложных ансамблей фрагментов ДНК при проведении обычной и эмульсионной полимеразной цепной реакции для совершенствования методов конструирования библиотек антител.

2. Разработать эффективную систему гетерологической экспрессии для получения растворимых однодоменных антител высокой степени очистки в нативной конформации.

3. Изучить структурные и биохимические характеристики однодоменных антител к внеклеточному домену рецептора ErbB3.

4. Изучить связывание однодоменных антител с рецептором ErbB3 и их функциональную активность на клеточных линиях рака молочной железы.

**Методология и методы исследования.** В работе применены различные методы биохимии, структурной и клеточной биологии. Для создания генетических конструкций применены методы молекулярного клонирования. Анализ генетических последовательностей и клонального разнообразия библиотек проведен при помощи секвенирования следующего поколения (NGS). Для получения рекомбинантных однодоменных антител и фрагментов рецептора

применены методы гетерологической экспрессии и различные хроматографические техники. Биохимическая характеристика и исследования стабильности однодоменных антител включали использование методов масс-спектрометрии и спектроскопии собственной флуоресценции белков. Для структурных исследований применены методы спектроскопии кругового дихроизма, макромолекулярной кристаллографии и молекулярного моделирования. Функциональные исследования однодоменных антител задействовали методы измерения поверхностного плазмонного резонанса, конфокальной флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Предложенная теоретическая модель точно описывает процесс амплификации сложных библиотек ДНК при проведении полимеразной цепной реакции, тем самым создавая теоретическую основу для совершенствования методов конструирования библиотек антител, сохраняющих их клональное разнообразие.

2. Гетерологическая экспрессия в цитоплазме бактерий *E. coli*  $\Delta trxB \Delta gor$  сDsbC в виде химерной конструкции с белком SUMO позволяет более эффективно по сравнению с классической системой периплазматической экспрессии получать однодоменные антитела ламы.

3. Разработанные однодоменные антитела к рецептору ErbB3 обладают высокой термодинамической стабильностью и нативной структурой иммуноглобулинового домена; полученные кристаллические структуры высокого разрешения позволяют изучить конформации гипервариабельных участков и построить модель связывания с эктодоменом рецептора ErbB3.

4. Два разработанных однодоменных антитела неконкурентно связываются с эпитопами на субдоменах I и III эктодомена рецептора ErbB3 с наномолярной аффинностью и эффективно подавляют ErbB3-зависимую пролиферацию HER2<sup>-</sup> и HER2<sup>+</sup> клеток рака молочной железы как посредством прямой конкуренции с лигандом, так и без нее.

**Научная новизна полученных результатов.** В результате исследования разработан новый иммунотерапевтический подход к блокированию активации рецептора ErbB3 в опухолевых клетках. Впервые для этой цели созданы особые неканонические антитела верблюдовых, не имеющие легких цепей.

В рамках исследования развиты технологии отбора и синтеза однодоменных антител. Впервые изучены фундаментальные закономерности, определяющие эффективность амплификации и эволюцию клонального разнообразия

библиотек. Разработан метод гетерологической экспрессии в цитоплазме бактерий *E. coli* для эффективного получения фолдированных растворимых однодоменных антител без молекулярных тагов. Показана высокая термодинамическая стабильность созданных однодоменных антител и проанализированы ее структурные детерминанты.

Два полученных антитела являются первыми высокоаффинными ингибирующими однодоменными антителами к внеклеточному домену рецептора ErbB3. Продемонстрировано, что они связываются неконкурентно с двумя эпитопами на рецепторе и блокируют его активацию различными путями. Оба антитела проявляют функциональную активность и подавляют ErbB3-зависимую пролиферацию клеток рака молочной железы.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Значимость работы обусловлена ее вкладом в развитие технологий молекулярной иммунологии и в исследования однодоменных антител как нового класса молекул для терапии и диагностики.

Технология библиотек ДНК является важнейшим инструментом отбора антител необходимой специфичности, при этом сохранение клонального разнообразия необходимо для поиска редких функционально активных антител. В работе предложена теоретическая модель, предсказывающая эффективность амплификации библиотек при использовании обычной и эмульсионной полимеразной цепной реакции. Данная модель хорошо согласуется с экспериментальными данными и представляет теоретическую основу для анализа эволюции репертуара библиотек при их амплификации.

В исследовании получены фундаментальные знания о свойствах однодоменных антител. Показано, что консервативная дисульфидная связь в однодоменном антителе может отсутствовать при сохранении фолдинга, высокой стабильности и функции. Полученные структуры высокого разрешения и сравнительные исследования денатурации однодоменных антител позволили выявить вероятные детерминанты их стабильности. Исследование обладает высокой практической значимостью, поскольку разработанные методы получения однодоменных антител являются универсальными и могут быть применены для других молекул данного класса. Разработанные однодоменные антитела, помимо потенциального терапевтического применения, могут также быть использованы для визуализации рецептора ErbB3 и диагностики.

**Личный вклад автора.** Все представленные в диссертации научные результаты получены автором лично. Эксперименты по созданию генетических конструкций, экспрессии и очистке рекомбинантных белков, изучению

биохимических характеристик однодоменных антител, макромолекулярной кристаллографии, изучению взаимодействия однодоменных антител с рецептором и оценке их антипролиферативной активности проведены автором собственноручно в лаборатории нанобиотехнологий Алферовского университета. Работа по изучению амплификации библиотек ДНК выполнена в соавторстве с Л. А. Овчинниковой. Л. А. Овчинниковой созданы библиотеки, разработаны методы эмульсификации и подобраны условия амплификации, проведен количественный анализ продуктов; автором проведен анализ данных секвенирования следующего поколения для библиотек, изучены ошибки в фрагментах ДНК и построена теоретическая модель, описывающая процесс амплификации. Иммунизация лам и отбор кандидатных антител проводились компанией «Биокад» и в диссертации подробно не рассматриваются.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность результатов обусловлена применением разнообразных взаимодополняющих экспериментальных методов, высокой воспроизводимостью в сериях независимых экспериментов, и статистическим анализом полученных данных. Основные результаты исследования были представлены на ряде конференций и семинаров, в частности: на 4-й и 5-й международной школе и конференции “Saint Petersburg OPEN” (Санкт-Петербург, 2017 г., 2018 г.); на семинарах в Индустриальном партнере проекта — ЗАО «Биокад» (Санкт-Петербург, 2017 г.); на 42-й научной конференции с международным участием «Неделя науки СПбПУ» (Санкт-Петербург, 2018 г.); на 6-м всероссийском научном форуме «Наука будущего — наука молодых» (Москва, 2021 г.); на семинаре в Институте экспериментальной медицины (Санкт-Петербург, 2022 г.).

**Структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, трех основных глав, заключения и выводов. Общий объем диссертации составляет 147 страниц, включая 31 рисунок и 11 таблиц. Список литературы содержит 261 источник.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 12 работ, в том числе 5 статей в рецензируемых научных журналах, индексируемых в международной базе данных Scopus, 1 патент и 6 тезисов докладов.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Глава 1. Обзор литературы**

В первой главе диссертации рассмотрены структурные и функциональные характеристики рецепторов эпидермального фактора роста ErbB, их лиганды и механизм активации. На примере наиболее изученных рецепторов семейства,

EGFR и HER2, рассмотрены механизмы нарушения сигнализации и их роли в развитии опухолей. Далее показано, что ErbB3 является коактиватором других рецепторов ErbB и обеспечивает резистентность опухолей к ингибированию HER2. Продемонстрировано, что блокирование рецептора ErbB3 является эффективной стратегией преодоления резистентности, а сам рецептор — важной терапевтической мишенью. Описаны различные подходы к блокированию рецепторов HER2 и ErbB3 и терапевтические антитела в стадии клинических исследований. На основе структурных данных визуализированы эпитопы и механизмы действия антител к рецептору ErbB3. В последнем разделе главы предложен новый подход к блокированию ErbB3 с использованием неканонических антител верблюдовых. Рассмотрены характеристики этих особых антител, способы их отбора при помощи технологий ДНК библиотек и фагового дисплея, и системы для их экспрессии. Проанализированы существующие проблемы в данной области и направления развития.

## Глава 2. Материалы и методы

**Материалы.** Приведены использованные в работе реагенты, расходные материалы, штаммы бактерий и клеточные линии млекопитающих. Для клонирования использованы штаммы бактерий *E. coli* XL-1 Blue (Евроген) и *E. coli* 10G (Lucigen). Для экспрессии белков применены штаммы *E. coli* BL21(DE3) (Евроген), *E. coli* SHuffle T7 Express (New England Biolabs) и клетки CHO (Биокад). В функциональных экспериментах использованы следующие линии клеток рака молочной железы: MCF-7 (ИНЦ РАН), BT-474 (НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова), SK-BR-3 (Биокад). В качестве контролей использованы линии K562, HeLa и Hep G2 (ИНЦ РАН).

**Молекулярное клонирование и секвенирование.** Описано клонирование кодирующих однодоменные антитела фрагментов в векторы pSolSUMO и pET22b для цитоплазматической и периплазматической бактериальной экспрессии. В случае pSolSUMO клетки *E. coli* 10G трансформированы смесью линейаризованного вектора и линейного кодирующего фрагмента с гомологичными вектору участками. В случае pET22b проведена интеграционная ПЦР с «мегапраймером», обработка рестриктазой DpnI и трансформация клеток *E. coli* XL-1 Blue. В разделе приведены основные характеристики полученных плазмид, их карты, и аминокислотные последовательности экспрессируемых белков. Далее описан разработанный метод обработки данных секвенирования следующего поколения (NGS) для анализа ошибок в библиотеках ДНК. При помощи программы *cutadapt* в парных рядах идентифицированы 5' и 3' адаптеры



и отобраны риды с адаптерами без делеций и инсерций. Последовательности после удаления адаптеров картированы на исходную ДНК библиотеку при помощи программы *minimap2*, далее проведено парное выравнивание по Смит-Ватерману при помощи пакета *SSW*. Парные выравнивания использованы для подсчета покрытия библиотеки и количества ридов с различными типами ошибок. Статистический анализ проведен в пакете *GraphPad Prism*.

**Экспрессия и очистка рекомбинантных белков.** Описаны методы экспрессии и очистки рекомбинантных однодоменных антител и фрагментов рецептора ErbB3. Для цитоплазматической экспрессии использованы бактерии *E. coli* BL21(DE3) и *E. coli* SHuffle. Бактерии росли в среде TB, для индукции экспрессии белка добавлялась *L*-рамноза, и культивация продолжалась 14 ч при температуре 27–29 °С. После ультразвукового лизиса бактерий экстракт преципитирован сульфатом аммония, и химерные белки с гистидиновыми тагами выделены при помощи металл-хелатной хроматографии. Белок SUMO с гистидиновым тагом отделен от однодоменного антитела TEV протеазой, после чего удален негативной металл-хелатной хроматографией. Финальная очистка антител проведена посредством высокоразрешающей ионообменной хроматографии и гель-фильтрации. Для выделения однодоменных антител из периплазмы использован классический протокол холодного осмотического шока, после чего очистка проведена аналогично описанной выше. Фрагменты рецептора ErbB3 выделены из культуральной среды клеток CHO при помощи металл-хелатной либо аффинной хроматографии.

**Анализ структуры и стабильности однодоменных антител.** В разделе описаны биохимические методы характеристики однодоменных антител. Вторичная структура изучена при помощи спектроскопии кругового дихроизма на приборе Chirascan (Applied Photophysics). Спектры измерены в диапазоне 190–250 нм, усреднены, и проанализированы в программе *BeStSel* для определения долей элементов вторичной структуры. Агрегация антител изучена при помощи гель-фильтрации на хроматографе Acquity (Waters) с использованием колонки Superdex 75 и серии белков-стандартов. Свободные тиольные группы в антителах определены спектрофотометрически при помощи реагента Элмана в денатурирующих условиях. Дисульфидные связи определены по модифицированному методу Элмана после восстановления белков избытком сульфита натрия и определения общего количества тиольных групп путем реакции с 2-нитро-5-тиосульфобензоатом натрия (NTSB), лизоцим использован в качестве контроля. Посттрансляционные модификации изучены при помощи масс-спектрометрии с электроспрей-ионизацией на приборе maXis Q-TOF

(Bruker). После усреднения масс-спектров по зарядовым состояниям, полученные изотопные распределения аппроксимированы различными брутто-формулами для выявления небольших изменений молекулярной массы вследствие модификаций белка. Для измерения кривых денатурации приготовлены серии растворов однодоменных антител с мочевиной в концентрации от 0 до 10 М. Измерения флуоресценции проведены на спектрометре Chirascan (Applied Photophysics) в диапазоне 300–500 нм при возбуждении светом с длиной волны 280 нм. Доли денатурированного белка определены по изменению флуоресценция остатков триптофана в антителах. Каждая серия образцов исследована при различных температурах в диапазоне 10–65 °С. Кривые денатурации аппроксимированы сигмоидой для определения параметров перехода клубок-глобула.

**Макромолекулярная кристаллография и моделирование.** Описана кристаллизация однодоменного антитела, съемка и обработка рентгеновских данных и моделирование комплексов антител с рецептором. Поиск условий кристаллизации проведен с использованием коммерческих наборов реагентов. Оптимизация двух условий кристаллизации (с кадмием и без) и рост кристаллов проведены в 24-луночных планшетах методом висящей капли при 20 °С. Для измерения дифракции кристаллы вымочены в криопротекторном растворе с 25% глицерина и заморожены в потоке азота при 100 К (кристаллы без кадмия), либо помещены в кварцевые капилляры (кристаллы с кадмием). Дифракционные данные сняты на приборе Карра Apex II (Bruker) с использованием излучения  $\text{CuK}\alpha$  1.54 Å. Данные интегрированы в программе *SAINTE* для определения интенсивности рентгеновских рефлексов и нормированы в программе *SADABS*. Параметры элементарной ячейки определены в *XPREF*, дальнейшая обработка проведена в пакете *Phenix*. Для моделирования структур комплексов внеклеточного домена рецептора ErbB3 с однодоменными антителами использовалась модель машинного обучения *AlphaFold Multimer*. Расчеты проведены с использованием *ColabFold*. Визуализация всех структур белков в диссертации проведена в *PyMol* либо *Illustrate*.

**Исследования связывания однодоменных антител с рецептором.** Описаны методы поверхностного плазмонного резонанса и конфокальной флуоресцентной микроскопии для изучения связывания антител с рецептором ErbB3 и экспрессирующими ErbB3 клетками. Эксперименты по поверхностному плазмонному резонансу проведены при 37 °С на приборе Biacore T200 (GE Healthcare). Фрагменты рецептора ErbB3 иммобилизованы на чипах CM5 через аминокислотные группы. Полученные сенсограммы аппроксимированы в программе

*Biacore Evaluation* для определения кинетических констант  $k_a$  и  $k_d$ . Равновесные константы диссоциации  $K_D$  получены путем аппроксимации равновесных кривых связывания уравнением Хилла, либо как отношение кинетических констант. Для эпитопного картирования и исследования конкуренции антител с лигандом проведены эксперименты по связыванию *in tandem*. Первое антитело или лиганд инжестировалось на чип в течение 10 минут для насыщения связывания с рецептором, после чего незамедлительно следовала инъекция смеси двух антител либо антитела и лиганда. Для конфокальной микроскопии однодоменные антитела и трастузумаб конъюгированы с флуоресцентными метками sulfo-Cy5 и AF488. Стекла с прикрепленными клетками окрашены буфером с добавлением 5 мкг/мл флуоресцентно меченых антител и красителя Hoechst 33342 без фиксации и пермеабиллизации. Съемка изображений проведена на микроскопе AxioObserver Z1 (Carl Zeiss). Полученные для разных оптических каналов снимки совмещены для изучения ко-локализации антител.

#### **Изучение антипролиферативной активности однодоменных антител.**

Описаны эксперименты по подавлению пролиферации клеток рака молочной железы однодоменными антителами. Используются клеточные линии аденокарциномы молочной железы MCF-7 и SK-BR-3, а также линия HeLa в качестве отрицательного контроля. Клетки культивировались в среде DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки. Для проведения тестов клетки отмывались от ростовой среды и перерастворялись в тестовой среде с 0.3% (MCF-7) либо 10% (SK-BR-3) сыворотки и 50 нг/мл херегулина  $\beta_1$ , после чего переносились в 96-луночный планшет. На следующий день в лунки добавлялись серийно разведенные антитела в тестовой среде. Планшеты инкубировались 5 дней, затем пролиферация клеток оценивалась при помощи метаболического красителя MTS при помощи планшетного спектрофотометра Multiskan GO (Thermo). Кривые подавления пролиферации усреднены по трем независимым биологическим экспериментам. Эффективные концентрации  $EC_{50}$  получены аппроксимацией экспериментальных данных уравнением Хилла. Выживаемость клеток после обработки антителами также оценена методом проточной цитофлуориметрии. Для каждого эксперимента 25 000 клеток SK-BR-3 рассеивались в лунки 24-луночного планшета в тестовой среде. Через сутки к клеткам добавлялась смесь однодоменных антител BCD090-P1 и BCD090-M2 в различных концентрациях. Анализ выживаемости проводился на четвертый и седьмой дни инкубации. Клетки снимались и окрашивались иодистым пропидием, и анализ клеточных популяций проводился на проточном цитофлуориметре FACSCanto (BD).

### Глава 3. Результаты и их обсуждение

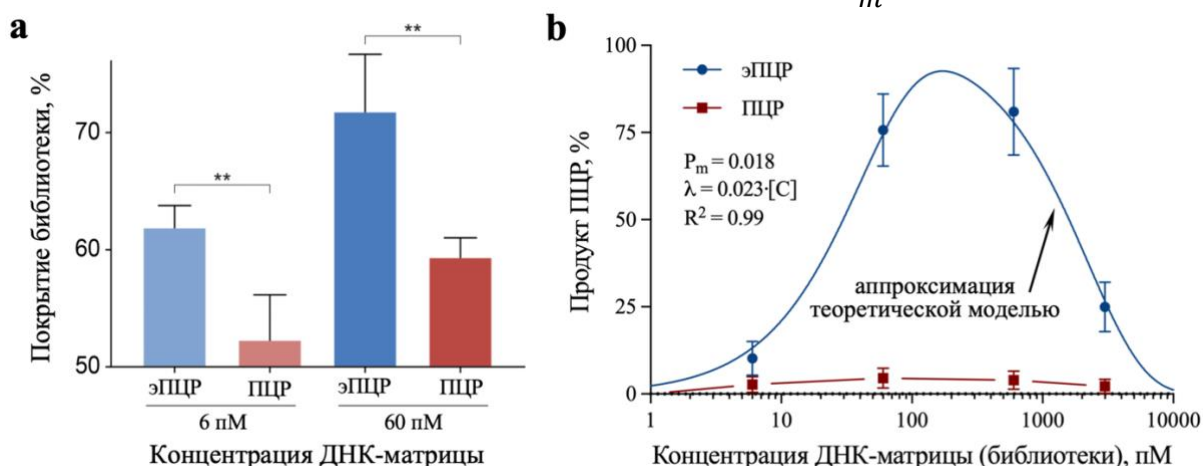
**Совершенствование технологий отбора антител.** Раздел посвящен изучению ошибок при амплификации сложных библиотек ДНК и созданию теоретической модели эмульсионной ПЦР. Важной проблемой является рекомбинация гомологичных фрагментов ДНК при проведении ПЦР, что приводит к снижению эффективности амплификации и деградации репертуара библиотек. Описаны результаты изучения ошибок (инсерций, делеций, замен) и клонального разнообразия (покрытия) в синтетической библиотеке из 12 000 фрагментов ДНК. Результаты получены путем анализа данных NGS секвенирования библиотеки после ее амплификации при помощи обычной и эмульсионной ПЦР. Показано (**рис. 1а**), что эмульсионная ПЦР значительно лучше сохраняет клональное разнообразие библиотеки ДНК. Далее построена теоретическая модель, описывающая эффективность амплификации библиотеки при эПЦР. В предположении, что число молекул в капле эмульсии описывается распределением Пуассона, введены два параметра,  $\lambda$  и  $P_m$ . Параметр  $\lambda$  – среднее количество молекул ДНК-матрицы в капле (плотность упаковки),  $P_m$  – вероятность взаимного подавления амплификации двумя разными фрагментами библиотеки (сложность библиотеки). Получено общее выражение для эффективности амплификации  $Y$  и рассмотрены два предельных случая, экспоненциальная амплификация и насыщение реакции:

экспоненциальная амплификация:

$$Y = \lambda \cdot e^{-P_m \lambda}$$

насыщение реакции («плато»):

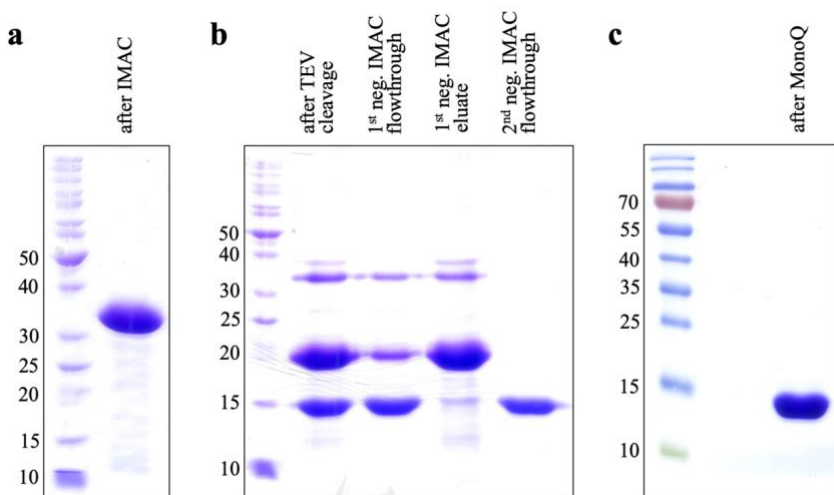
$$Y = \frac{1}{1 - P_m} \cdot (e^{-P_m \lambda} - e^{-\lambda})$$



**Рис. 1.** Теоретическая модель амплификации и анализ покрытия библиотек. **(а)** Покрытие библиотеки после амплификации, то есть количество фрагментов без делеций и инсерций, по данным NGS секвенирования. Эмульсионная ПЦР (эПЦР) статистически значимо увеличивает покрытие по сравнению с обычной ПЦР ( $p < 0.01$ ,  $t$ -тест). **(б)** Аппроксимация экспериментальных данных для амплификации библиотеки при помощи обычной и эмульсионной ПЦР при помощи разработанной теоретической модели.

Построенная модель прекрасно согласуется с экспериментальными данными (**рис. 1b**) и позволяет лучше понять и оптимизировать процессы, происходящие при амплификации сложных библиотек ДНК.

**Разработка системы гетерологической экспрессии однодоменных антител.** В разделе описана экспрессия трех однодоменных антител (называемых **B**CD090-**P**1, **B**CD090-**M**2 и **B**CD090-**M**456) в цитоплазме бактерий *E. coli*  $\Delta$ trxB  $\Delta$ gor cDsbC (штамм SHuffle) в виде химеры с белком SUMO, их очистка и удаление тага, и сравнение разработанной системы с классическим методом периплазматической экспрессии. Основной проблемой получения однодоменных антител является обеспечение их эффективного фолдинга с замыканием дисульфидной связи. Для решения проблемы созданы плазмиды кодирующие химерные белки, в которых на N-концах антител расположены гистидиновый таг, небольшой убиквитин-подобный белок SUMO (11 кДа) и сайт TEV протеазы. Высокая растворимость и быстрый фолдинг SUMO препятствуют агрегации химерной молекулы, а окислительная среда цитоплазмы мутантного штамма *E. coli*  $\Delta$ trxB  $\Delta$ gor и дисульфид-изомераза DsbC в ней способствуют формированию дисульфидной связи. В результате применения такого подхода выделены растворимые химерные белки, от которых затем протеолитически отделены однодоменные антитела, и очищены до гомогенности (**рис. 2**).



**Рис. 2.** Анализ антитела на разных этапах очистки. **(a)** Химерный белок после металл-хелатной хроматографии. **(b)** Расщепление химерного белка TEV протеазой и удаление белка SUMO с гистидиновым тагом **(c)** Антитело после анионообменной хроматографии.

Проведено сравнение разработанной системы с экспрессией в периплазме, а также сравнение примененного штамма *E. coli* SHuffle со стандартным экспрессионным штаммом *E. coli* BL21(DE3) (**табл. 1**). Экспрессия в цитоплазме дает вплоть до 200 мг рекомбинантного белка на литр культуры, против 10 мг в периплазме. Все три антитела эффективно экспрессируются в *E. coli* SHuffle, в то время как BCD090-M2 не удается получить в *E. coli* BL21(DE3).

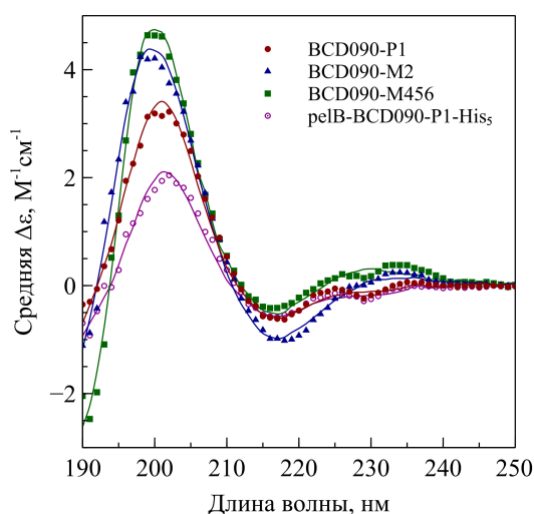
Разработанная система экспрессии однодоменных антител обладает одной из наивысших эффективностей среди опубликованных в научной литературе.

**Таблица 1.** Анализ эффективности цитоплазматической и периплазматической экспрессии однодоменных антител в *E. coli* штаммов *SHuffle* и *BL21(DE3)*. Данные на 1 литр среды.

Экспрессия:	Цитоплазматическая <i>E. coli SHuffle</i> / <i>E. coli BL21(DE3)</i>			Переплазматическая <i>E. coli BL21(DE3)</i>
	BCD090- P1	BCD090- M2	BCD090- M456	pelB-BCD090-P1-His <sub>5</sub>
Финальная OD <sub>600</sub>	9.0 / 12.4	8.8 / 9.7	8.7 / 9.5	5.4
Масса клеток, г	14.0 / 20.8	14.4 / 18.0	12.8 / 18.4	9.4
Химерный белок, мг	146 / 266	48 / —	184 / 118	9.5

### Структурные и биохимические характеристики однодоменных антител.

Раздел посвящен изучению вторичной структуры, агрегации, дисульфидных связей и термодинамической стабильности полученных антител. Вторичная структура изучена методом спектроскопии кругового дихроизма (рис. 3).



**Рис. 3.** Анализ вторичной структуры однодоменных антител при помощи спектроскопии кругового дихроизма. Экспериментальные данные показаны символами, результаты аппроксимации в программе *BeStSel* обозначены линиями. Для всех антител преобладает антипараллельный  $\beta$ -лист (47–53%), также определяется  $\beta$ -изгиб (8–12%), вклад  $\alpha$ -спиралей отсутствует.

Путем деконволюции спектров с использованием алгоритма *BeStSel* оценены доли элементов вторичной структуры, среди которых преобладает антипараллельный  $\beta$ -лист (47–53%). Также проанализирована третичная структура на уровне общей архитектуры и топологии (фолда). Для всех антител определена архитектура  $\beta$ -сэндвича и топология IgG-домена/Jelly Roll, что соответствует нативной конформации антитела.

По данным аналитической гель-фильтрации все однодоменные антитела находятся в мономерной форме, олигомеризация и агрегация не детектируется. Свободные тиольные группы и дисульфидные связи в белках количественно изучены методом Элмана и обнаружено, что в случае антител BCD090-P1 и BCD090-M2 два цистеина формируют внутримолекулярную дисульфидную

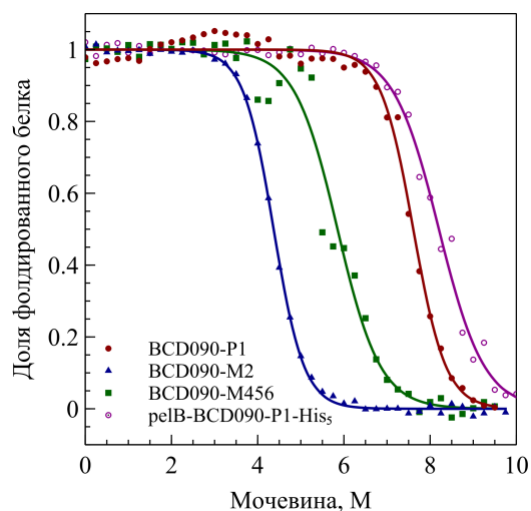
связь, как и ожидается для нативной конформации IgG-домена. В случае BCD090-M456 цистеины, напротив, находятся в редуцированной форме (табл. 2). Для более детального анализа пост-трансляционных модификаций проведены масс-спектрометрические эксперименты и изучены серии пиков изотопного распределения. Масс-спектрометрия подтверждает высокую молекулярную гомогенность белков, наличие дисульфидных связей в BCD090-P1 и BCD090-M2 (– 2 Да) и отсутствие в BCD090-M456. Таким образом, данное антитело обладает необычной конформацией со структурой IgG-домена без канонической дисульфидной связи.

**Таблица 2.** Свободные цистеины и дисульфидные связи в однодоменных антителах по результатам теста Элмана и измерений с NTSB после восстановления с Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>.

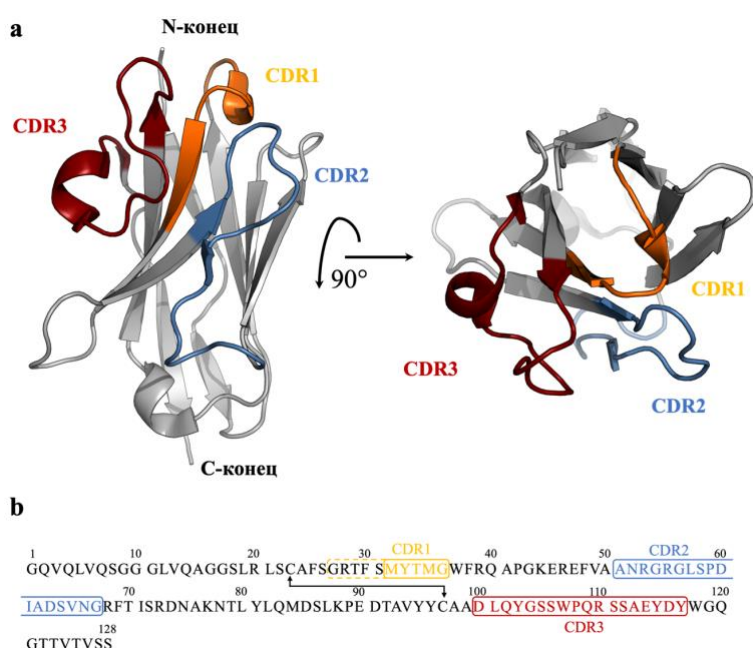
Белок	Свободные цистеины		Дисульфидные связи суммарно SH после восстановления	
	расчет	по Элману	расчет	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> + NTSB
BCD090-P1	0	< 0.02	1	0.96 ± 0.03
BCD090-M2	0	< 0.02	1	1.00 ± 0.01
BCD090-M456	0	0.97 ± 0.07	1	0.83 ± 0.10
Лизоцим (контроль)	0	< 0.02	4	3.1 ± 0.4

Конформационная стабильность антител изучена по сериям кривых денатурации в мочеvine, полученных для разных температур и концентраций денатуранта путем анализа изменения спектров флуоресценции триптофанов в белках (рис. 4). Все три однодоменных антитела обладают высокой стабильностью, а антитело BCD090-P1 отличается уникальными характеристиками, с половинной денатурацией при 7.6 М мочеvine.

**Рис. 4.** Сравнение кривых денатурации однодоменных антител BCD090-P1, BCD090-M2 и BCD090-M456 при 20 °С. Символами показаны экспериментальные значения, линиями результаты аппроксимации в модели двух состояний. Антитело BCD090-P1 обладает уникальной стабильностью с половинной денатурацией при 7.6 М мочеvine. Получены значения свободной энергии денатурации антител: 11.7 ± 1.4 ккал·моль<sup>-1</sup> (BCD090-P1), 7.2 ± 0.16 ккал·моль<sup>-1</sup> (BCD090-M2) и 6.9 ± 0.8 ккал·моль<sup>-1</sup> (BCD090-M456).



**Исследование пространственных структур высокого разрешения.** В разделе описана кристаллизация, расшифровка пространственных структур антитела BCD090-M2 и моделирование комплекса с рецептором ErbB3. Кристаллы антитела получены в двух разных изоформах, в пространственной группе C2 и в пространственной группе P1 с ионами кадмия. Структура антитела в группе C2 решена методом молекулярного замещения (**рис. 5**). Для решения структуры кристалла с ионами кадмия применен метод одноволновой аномальной рентгеновской дифракции (Cd-SAD) на длине волны стандартного рентгеновского источника CuK $\alpha$ . Полученные структурные модели валидированы и депонированы в базу данных *Protein Data Bank* под номерами 6EZW и 6F0D.



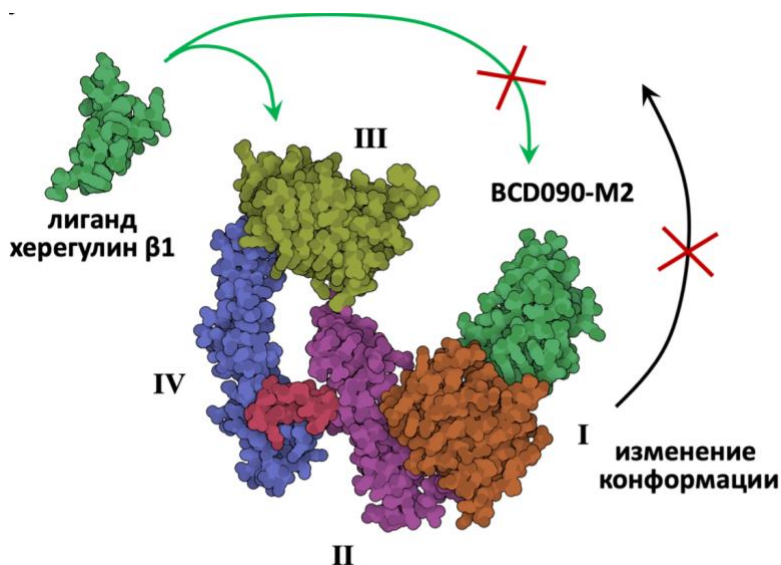
**Рис. 5.** Кристаллическая структура антитела BCD090-M2, полученная в пространственной группе C2 с разрешением 1.6 Å (депонирована в PDB под номером 6EZW).

(a) Схематичное изображение структуры в двух ориентациях, каркасные области серые, гипервариабельные участки CDR отмечены цветом.

(b) Аминокислотная последовательность антитела с обозначением CDR.

Полученные структуры антитела BCD090-M2 практически идентичны, за исключением CDR2, который находится в кристаллах в различных конформациях. Предположительно, эффект связан с неконсервативным остатком пролин-60, стереохимия которого создает напряжения в CDR2. Вероятно, низкая стабильность BCD090-M2 по сравнению с другими антителами также связана с нестандартной конформацией CDR2. Также показано, что структура CDR3 не относится ни к одной из известных канонических конформаций по Хотиа. CDR3 вероятно не похож на известные CDR в антителах из-за существенной длины (18 остатков), наличия пролина в нестандартной цис-конформации и сразу четырех ароматических остатков.

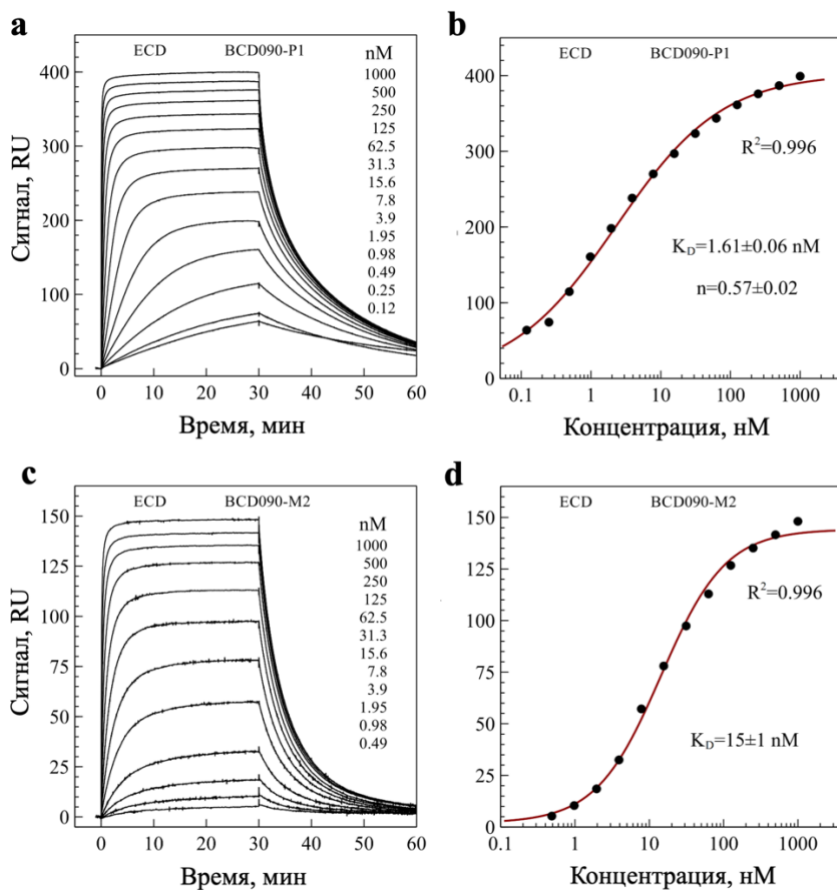




**Рис. 6.** Модель связывания однодоменного антитела BCD090-M2 с эктодоменом рецептора ErbB3. Результат моделирования комплекса BCD090-M2 с эктодоменом ErbB3 в AlphaFold 2. Антитело связывается с субдоменом I, предполагаемый эпитоп перекрывается с сайтом связывания лиганда  $\beta 1$ .

Для анализа эпитопа антитела BCD090-M2 на рецепторе проведено моделирование их комплекса в *AlphaFold 2*. Наиболее вероятной является модель, в которой антитело связывается с эпитопом на субдомене I (**рис. 6**). Показано, что данный эпитоп перекрывается с сайтом связывания лиганда ErbB3 (херегулин  $\beta 1$ ), что позволило предположить механизм действия BCD090-M2, основанный на блокировании связывания лиганда и изменения конформации рецептора, необходимого для активации.

**Взаимодействие однодоменных антител с рецептором ErbB3.** Раздел посвящен измерению кинетики и аффинности связывания антител с рецептором, изучению их эпитопов и конкуренции с лигандом ErbB3. Методом поверхностного плазмонного резонанса получены кривые ассоциации и диссоциации антител с рецептором (сенсограммы, **рис. 7**) проведен их анализ и получены кинетические константы и равновесные константы диссоциации  $K_D$ . Аффинность ( $K_D$ ), вычисленная из кинетических измерений, хорошо согласуется со значениями из равновесных кривых связывания (**табл. 3**). Антитела BCD090-P1 и BCD090-M2 связываются с внеклеточным доменом рецептора с  $K_D$  равными 1.6 нМ и 15 нМ, соответственно. Интересно, что BCD090-M456 связывается с рецептором слабее, с микромолярной аффинностью, но при этом формирует наиболее стабильный комплекс. Медленная диссоциация BCD090-M456 сочетается с медленной ассоциацией, что дает умеренную аффинность. В отдельных экспериментах с изолированным субдоменом III рецептора ErbB3 показано, что антитело BCD090-P1 связывается с субдоменом III с такой же аффинностью, как и с полноразмерным внеклеточным доменом рецептора. Таким образом установлено, что эпитоп BCD090-P1 находится на субдомене III.

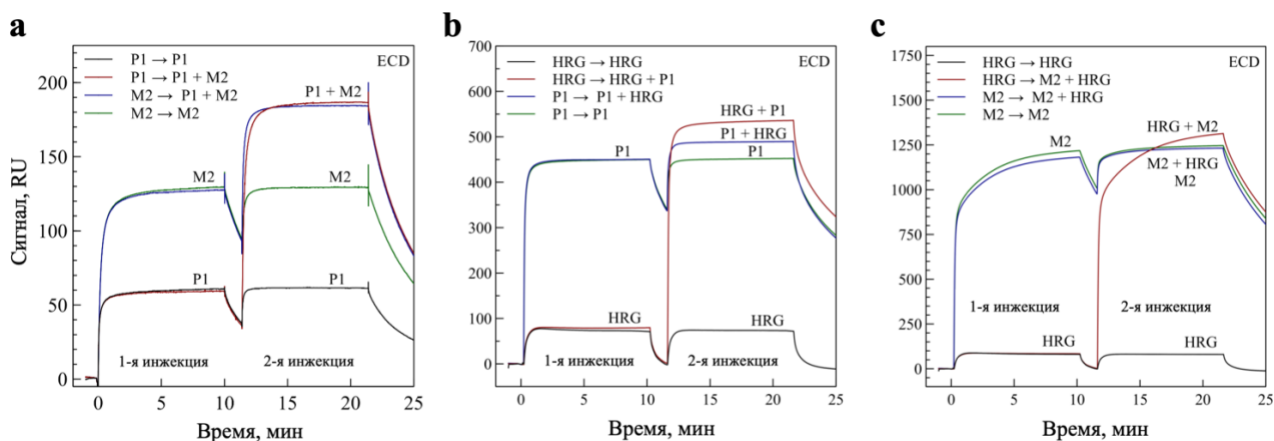


**Рис. 7.** Взаимодействие однодоменных антител с эктодоменом ErbB3. Данные получены методом поверхностного плазмонного резонанса. (а) Серии кривых ассоциации и диссоциации антитела BCD090-P1 с иммобилизованным рецептором. (б) Равновесная кривая связывания антитела BCD090-P1 и результат ее аппроксимации уравнением Хилла. (с) и (д) Аналогичный анализ для антитела BCD090-M2. Оба антитела взаимодействуют с ErbB3 с наномолярной аффинностью.

**Таблица 3.** Константы скоростей ассоциации и диссоциации, а также равновесные константы диссоциации  $K_D$ , полученные в результате анализа данных поверхностного плазмонного резонанса. Приведены средние значения  $\pm$  стандартное отклонение.

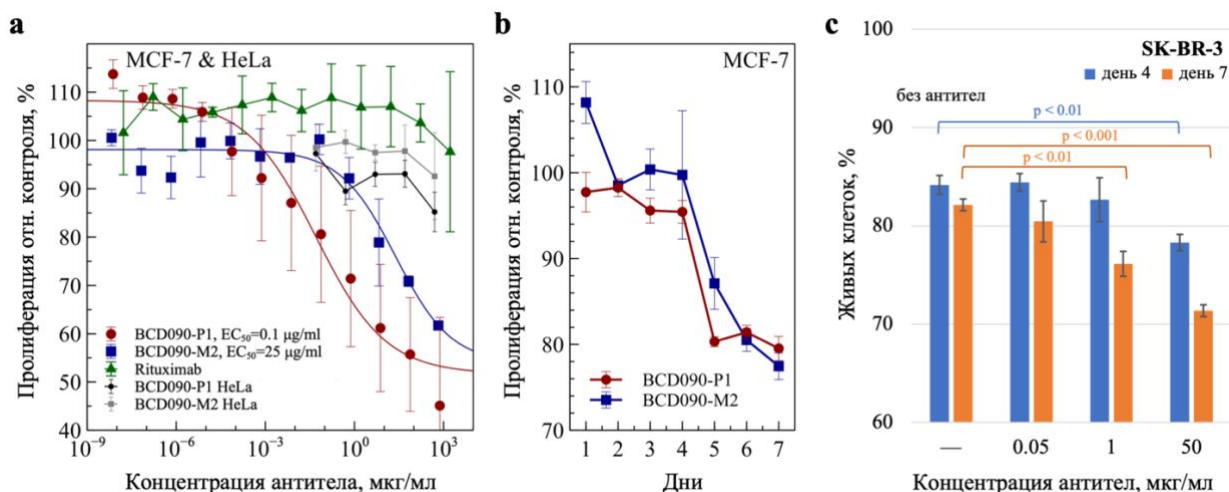
	$k_a \cdot 10^{-5}, M^{-1}s^{-1}$	$k_d \cdot 10^3, s^{-1}$	$K_D, nM$ из кинетики	$K_D, nM$ из равновесия
BCD090-P1	$19 \pm 4$	$3.0 \pm 1.0$	$1.6 \pm 0.2$	$1.61 \pm 0.06$
BCD090-M2	$2.2 \pm 0.4$	$3.6 \pm 0.1$	$16.5 \pm 2.0$	$15 \pm 1$
BCD090-M456	$0.0072 \pm 0.0002$	$2.2 \pm 0.2$	$3100 \pm 200$	$8600 \pm 800$
pelB-BCD090-P1-His5	$8.7 \pm 2.0$	$4.4 \pm 0.2$	$5.1 \pm 0.9$	$6.5 \pm 0.9$

В серии экспериментов по парному связыванию (рис. 8) обнаружено, что антитела BCD090-P1 и BCD090-M2 могут связываться с рецептором одновременно с образованием тройного комплекса, и, следовательно, имеют непересекающиеся эпитопы. Антитело BCD090-P1 не конкурирует с лигандом рецептора (херегулином  $\beta 1$ ) напрямую. BCD090-M2, напротив, полностью блокирует связывание херегулина. Известно, что херегулин взаимодействует с субдоменами I и III. Данные моделирования, отсутствие связывания с субдоменом III и блокирование взаимодействия рецептора с лигандом указывают на то, что BCD090-M2 связывается с субдоменом I.



**Рис. 8.** Изучение эпитопов связывания антител и конкуренции с лигандом ErbB3. (а) Антитела VCD090-P1 и VCD090-M2 одновременно и независимо друг от друга связываются с эктодоменом ErbB3, что свидетельствует о различии их эпитопов. (б) VCD090-P1 не блокирует связывание лиганда напрямую, образование тройного комплекса рецептор-антитело-лиганд возможно. (с) VCD090-M2 полностью блокирует связывание лиганда.

**Антипролиферативное действие однодоменных антител.** В разделе представлены результаты экспериментов по подавлению пролиферации клеток рака молочной железы однодоменными антителами. Оба антитела VCD090-P1 и VCD090-M2 подавляют пролиферацию экспрессирующих рецептор ErbB3 клеток. При этом антитела активны как в отношении клеток MCF-7 со средним уровнем экспрессии HER2, так и в отношении SK-BR-3, гиперэкспрессирующих HER2. Путем аппроксимации кривых подавления пролиферации MCF-7 получены значения эффективной концентрации  $EC_{50}$ , равные 0.1 мкг/мл (около 7 нМ) для VCD090-P1 и 25 мкг/мл для VCD090-M2 (рис. 9). В экспериментах на SK-BR-3 значения  $EC_{50}$  для VCD090-P1 и VCD090-M2 равны 15 мкг/мл и 3 мкг/мл. Для сравнения приведена эффективная концентрация для трастузумаба, терапевтического антитела к рецептору HER2, основному драйверу пролиферации в данных клетках, которая составляет 0.1 мкг/мл. Эффект снижения пролиферации продолжительный, что продемонстрировано на недельных кривых роста клеток. Более того, добавление антител ведет не только к снижению пролиферации, но и к снижению доли живых клеток, как показано для SK-BR-3 при помощи проточной цитофлуориметрии. Поскольку однодоменные антитела VCD090-P1 и VCD090-M2 взаимодействуют неконкурентно с субдоменами I и III рецептора ErbB3, и их действие обусловлено различными молекулярными механизмами, можно ожидать синергии при их совместном применении.



**Рис. 9.** Подавление *ErbB3*-зависимой пролиферации клеток аденокарциномы молочной железы. **(а)** Кривые подавления пролиферации различными концентрациями однодоменных антител BCD090-P1 и BCD090-M2. Клетки HeLa (*HER2*<sup>-</sup>, *ErbB3*<sup>-</sup>) и антитело к CD20 ритуксимаб использованы в качестве отрицательных контролей. Экспериментальные данные аппроксимированы для определения EC<sub>50</sub>. **(б)** Кривые роста клеток MCF-7 в присутствии антител в концентрации 50 мкг/мл. **(с)** Снижение выживаемости клеток SK-BR-3 в присутствии антител по данным проточной цитофлуориметрии.

### Заключение

В заключении кратко изложены основные результаты, подведены итоги работы и подчеркнуты преимущества разработанных антител. Сформулированы рекомендации по наиболее перспективным путям применения разработанных антител в иммунотерапии онкологических заболеваний. Во-первых, исследованные однодоменные антитела особенно хорошо подходят для дизайна биспецифических молекул к *HER2:ErbB3* либо бипаратопных антител к *ErbB3*. Неконкурентное связывание BCD090-P1 и BCD090-M2 с различными эпитопами на *ErbB3* позволяет предполагать, что бипаратопная молекула на их основе будет обладать повышенной авидностью и функциональной активностью. Во-вторых, исследованные однодоменные антитела идеально подходят для создания иммуноконъюгатов с цитотоксическими лекарствами ввиду их высокой стабильности, растворимости и потенциально хорошего проникновения в ткани. В-третьих, малый размер и эффективный фолдинг однодоменных антител позволяют разрабатывать терапевтические стратегии, в которых антитело кодируется при помощи мРНК и может не только синтезироваться *in vivo* и секретироваться из клетки, но и ингибировать *ErbB3*-зависимую сигнализацию внутриклеточно путем блокирования биосинтеза и транспорта рецептора до его презентации на клеточной мембране.

## Выводы

1. Впервые построена теоретическая модель, описывающая процесс амплификации сложных ансамблей фрагментов ДНК при проведении полимеразной цепной реакции в каплях эмульсии воды в масле. Предсказания модели хорошо согласуются с экспериментальными данными и создают теоретическую основу для понимания эффекта деградации клонального разнообразия при амплификации библиотек ДНК.

2. Наиболее эффективной системой получения растворимых однодоменных антител является их гетерологическая экспрессия в цитоплазме бактерий *E. coli* *AtrxB Δgor cDsbC* в виде химерной конструкции с белком SUMO.

3. Разработанные однодоменные антитела к рецептору ErbB3 обладают высокой термодинамической стабильностью. Полученные кристаллические структуры позволяют выявить вероятные молекулярные детерминанты конформационной стабильности, изучить паратоп связывания и построить модель комплекса с эктодоменом рецептора ErbB3.

4. Два разработанных однодоменных антитела BCD090-P1 и BCD090-M2 неконкурентно связываются с эпитопами на субдоменах III и I эктодомена рецептора ErbB3 с наномолярной аффинностью и эффективно подавляют ErbB3-зависимую пролиферацию HER2<sup>-</sup> и HER2<sup>+</sup> клеток рака молочной железы.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в рецензируемых журналах:

1. Targeting ErbB3 receptor in cancer with inhibitory antibodies from llama / **I. E. Eliseev**, V. M. Ukrainskaya, A. N. Yudenko [et al.] // *Biomedicines*. – 2021. – Vol. 9. – № 9. – P. 1106.
2. Liquid drop of DNA libraries reveals total genome information / S. S. Terekhov, **I. E. Eliseev**, L. A. Ovchinnikova [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2020. – Vol. 117. – № 44. – P. 27300-27306.
3. Cadmium SAD phasing at CuK $\alpha$  wavelength / **I. E. Eliseev**, A. N. Yudenko, V. M. Ukrainskaya, O. B. Chakchir // *F1000Research*. – 2019. – Vol. 8. – P. 84.
4. Crystal structures of a llama VHH antibody BCD090-M2 targeting human ErbB3 receptor / **I. E. Eliseev**, A. N. Yudenko, V. V. Vysochinskaya [et al.] // *F1000Research*. – 2018. – Vol. 7. – P. 57.
5. Thermodynamic analysis of the conformational stability of a single-domain therapeutic antibody / **I. E. Eliseev**, A. N. Yudenko, N. A. Besedina [et al.] // *Technical Physics Letters*. – 2017. – Vol. 43. – № 12. – P. 1088-1091.

## Патенты:

Патент № 2721854 Российская Федерация, МПК С07К 16/22 (2006.01).  
Однодоменное антитело, специфически связывающее рецептор ErbB3 человека, без канонической дисульфидной связи : № 2018147039 : заявл. 27.12.2018 : опубл. 25.05.2020 / А. Н. Юденко, **И. Е. Елисеев**, В. М. Украинская, О. Б. Чакчир ; заявитель СПБАУ РАН им. Ж. И. Алферова – 4 с. : 4 ил.

## Тезисы докладов:

1. Разработка систем экспрессии и очистки однодоменного анти-ErbB3 антитела из периплазмы и цитоплазмы *E. coli* для структурных исследований / **И. Е. Елисеев**, Н. А. Беседина, А. Н. Юденко [и др.] // Объединенный научный форум Международная научная конференция по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Ю. А. Овчинникова» и VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды», Москва. — 2017. Acta Naturae (Спецвыпуск). — С. 180.

2. Purification and biophysical characterization of a new single-domain antibody against human HER3 receptor / **I. E. Eliseev**, N. A. Besedina, A. N. Yudenko [et al.] // 4-я международная школа и конференция “Saint Petersburg OPEN 2017”, Санкт-Петербург. — 2017. Сборник тезисов. — С. 244-247.

3. Бактериальная экспрессия однодоменных антител к рецептору ErbB3 / В. М. Украинская, А. Н. Юденко, **И. Е. Елисеев** // 42-я научная конференция с международным участием «Неделя науки СПбПУ», Санкт-Петербург. — 2018. Материалы научной конференции. — С. 101-104.

4. Crystallization and X-ray structural studies of single-domain antibodies / **I. E. Eliseev**, A. N. Yudenko, O. B. Chakchir // 5-я международная школа и конференция “Saint Petersburg OPEN 2018”, Санкт-Петербург. — 2018. Сборник тезисов. — С. 138-139.

5. Phase diagrams of coil-globule transition in single-domain antibodies / A. A. Sakharov, A. N. Yudenko, O. B. Chakchir, **I. E. Eliseev** // 5-я международная школа и конференция “Saint Petersburg OPEN 2018”, Санкт-Петербург. — 2018. Сборник тезисов. — С. 170-171.

6. Однодоменные антитела для блокирования рецептора HER3 при раке молочной железы / **И. Е. Елисеев**, А. Д. Микушина, А. А. Вронская, О. В. Шамова // 3-й Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов и 10-й Российский симпозиум «Белки и пептиды», Москва. — 2021. Научные труды. — Т. 2. — С. 143.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- Akt** протеинкиназа В, группа из 3-х родственных серин/треониновых киназ
- CD20** В-лимфоцитарный антиген, мишень ритуксимаба
- CDR** гипервариабельные участки вариабельного домена, определяющие связывание с антигеном: H1–3 тяжелой цепи, L1–3 легкой цепи, 1–3 однодоменного антитела
- DsbC** бактериальный фермент дисульфид-изомераза
- ECD** внеклеточный домен (эктодомен) рецептора ErbB3, ECD<sup>III</sup> — субдомен III
- EGFR** рецептор эпидермального фактора роста, кодируемый геном ErbB1
- ErbB** семейство рецепторов эпидермального фактора роста ErbB1–4
- ErbB3** рецептор эпидермального фактора роста, кодируемый геном ErbB3, также HER3
- gor** бактериальный фермент глутатион-редуктаза
- HER2** рецептор эпидермального фактора роста, кодируемый геном ErbB2
- HRG** херегулин  $\beta 1$ , одна из изоформ NRG1
- IMAC** металл-хелатная хроматография
- MAPK** митоген-активируемые протеинкиназы, семейство протеинкиназ
- MTS** реагент для спектрофотометрического определения пролиферации, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2H-тетразолий
- NGS** секвенирование следующего поколения
- NTSB** 2-нитро-5-тиосульфобензоат натрия
- PI3K** фосфоинозитид-3-киназы
- PDB** база данных белковых структур *Protein Data Bank* ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org))
- Ras** семейство гомологичных ГТФаз, мощных онкогенов
- RMSD** среднеквадратичное отклонение
- SUMO** убиквитин-подобный белок
- TB** богатая ростовая среда для бактерий, “terrific broth”
- TEV** протеаза вируса табачной мозаики
- trxV** бактериальный фермент тиоредоксин-редуктаза
- ПЦР** полимеразная цепная реакция
- эПЦР** эмульсионная полимеразная цепная реакция