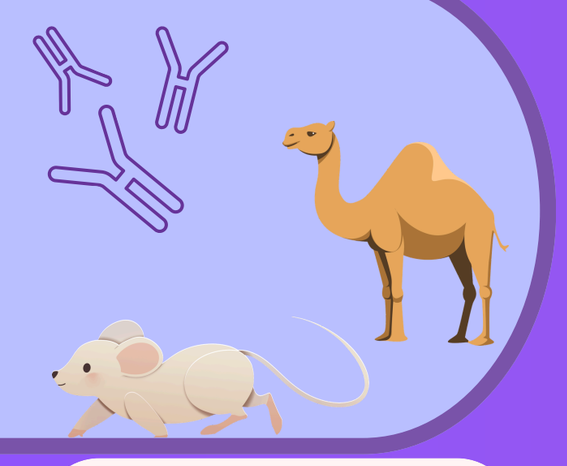


MICE CAME(L) TO THE RESCUE

Discovery and selection of spike protein binding antibodies

School of Molecular and Theoretical Biology

Sabancı Üniversitesi

INTRODUCTION

B cells are essential to the immune system, producing more than 1 billion unique antibodies, despite the human and mice genome containing no more than 30,000 genes. This huge diversity is primarily generated by the Variable Diversity Joining (V(D)J) recombination, with each V(D)J sequence coding for a unique antigen-recognition domain in heavy-chain antibodies.

This research utilised DNA sequences from transgenic mice with a deleted CH1 gene, forcing heavy-chain-only antibody production *(Figure 1)*.

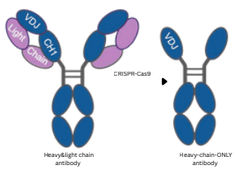


Figure 1: Heavy and light chain antibody (left) and heavy-chain-only antibody (right)

From mice immunised with the SARS-CoV-2 spike protein (Figure 2), heavy-chain antibody sequences were selected based on the following selection criteria:

1. Expanded clones (appeared in at least 3 cells)
2. mRNA for genes associated with germinal centre and plasma cells
3. Somatic hypermutations
4. Favourable folding in CDR3 region

The use of camelid-mice is a cost-effective model for discovering heavy-chain-only antibodies, which can be used to develop CAR-T therapy and as a source of nanobodies which have profound therapeutic applications, such as drug development.

В-лимфоциты создают более 1 миллиарда уникальных антител, хотя геномы человека и мыши содержат всего до 30 000 генов. Это разнообразие формируется в ходе V(D)J-рекомбинации, где каждая V(D)J-последовательность кодирует антигенраспознающий домен тяжелой цепи.

В работе использованы ДНК-последовательности трансгенных мышей с делецией гена CH1, запускающей синтез антител, состоящих только из тяжелых цепей (Рисунок 1).

Из мышей, иммунизированных спайк-белком SARS-CoV-2, мы отобрали V(D)J-последовательности тяжелых цепей по следующим критериям:

1. Экспансия клонов: минимум 3 клетки на клон.
2. Экспрессия мРНК: гены герминативных центров и плазматических клеток.
3. Соматические гипермутации.
4. Устойчивая фолдинг-структура: в области CDR3.

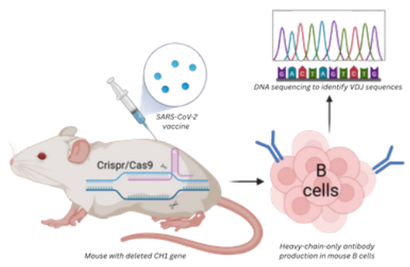


Figure 2: Genetically modified mice were immunised by Pfizer vaccine and their B cells were sequenced

Использование модели мышей, генетически модифицированной для продукции верблюжьих антител, является экономически эффективным для обнаружения антител к тяжелым цепям. Такие антитела могут быть использованы для разработки CAR-T-терапии и получения терапевтических наноантител.

HYPOTHESIS

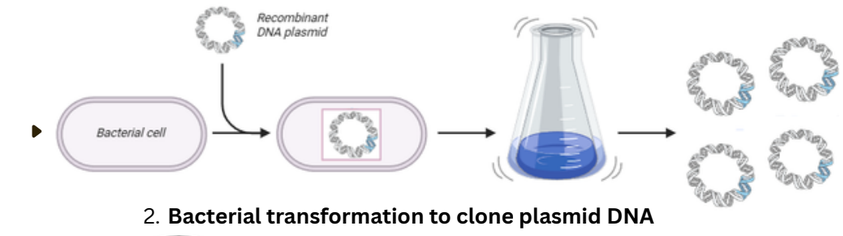
V(D)J selection criteria in mice will successfully identify heavy-chain-only antibodies that bind specifically to the spike protein from SARS-CoV-2.

Критерии отбора V(D)J у мышей позволят успешно идентифицировать антитела, содержащие только тяжелую цепь и специфически связывающиеся с шиповидным белком SARS-CoV-2.

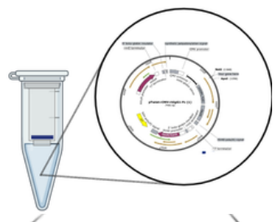
METHODS



1. **Sequence, annotation and alignment**

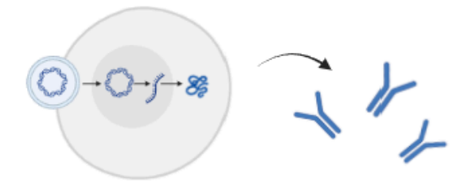


2. **Bacterial transformation to clone plasmid DNA**

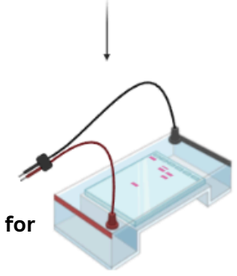


3. **Plasmid purification via Mini Prep**

4. **Restriction digest with Not1 and Apa1 enzymes**

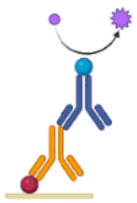


Secretion of heavy-chain-only antibodies



5. **Gel electrophoresis for verification of VDJ sequences**

6. **Transfection of HEK-293T cells with plasmid**



7. **ELISA to detect antibody production**

RESULTS

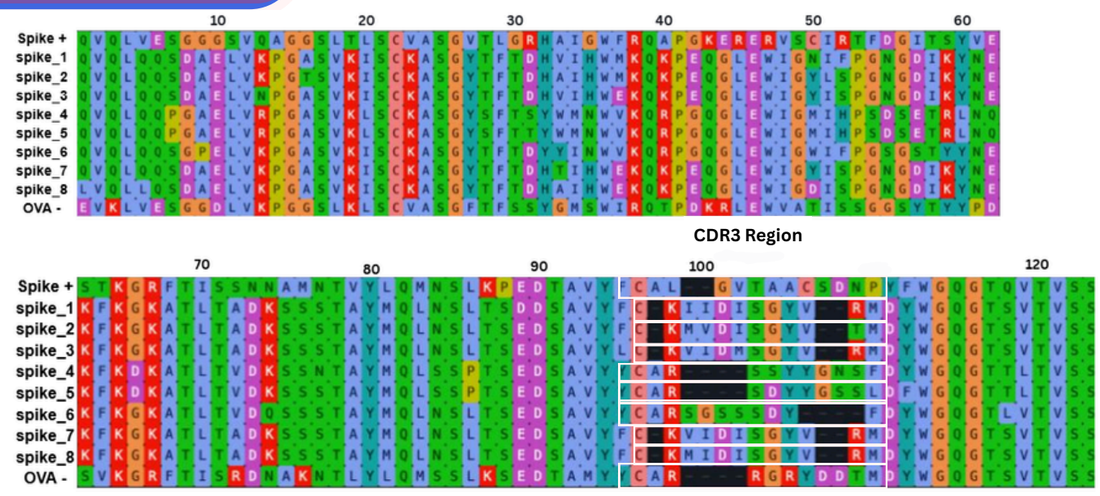


Figure 3: Aligment of V(D)J region in spike positive control, spike proteins (n=8), OVA negative control

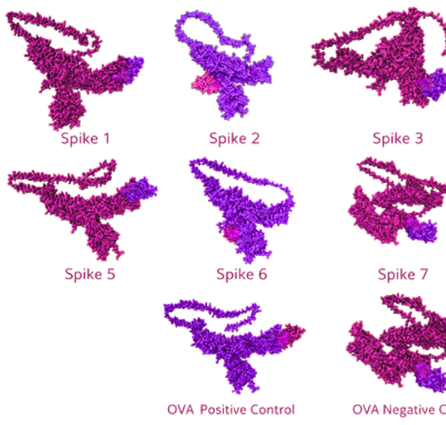


Figure 4: Predictive binding of antibodies (Mol*Viewer)

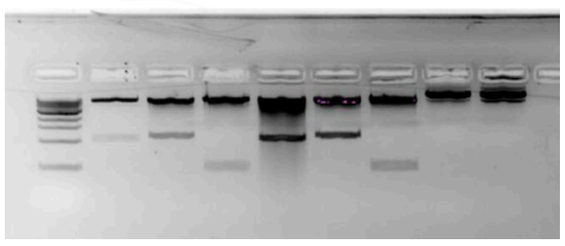


Figure 5: Gel electrophoresis of restriction digest products

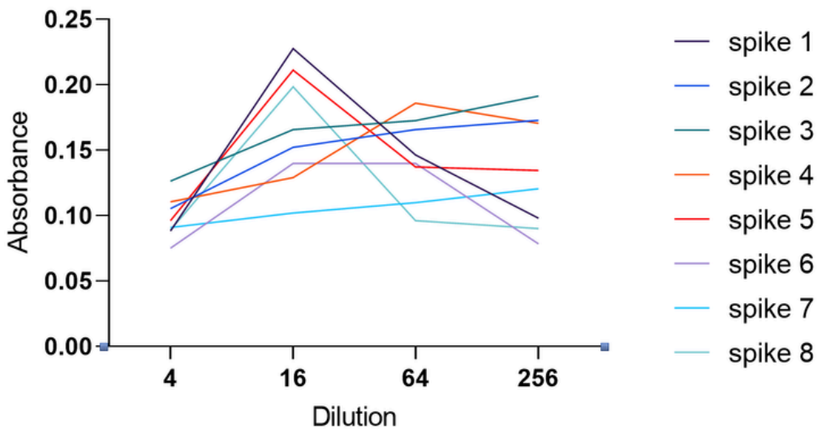


Figure 6: Target binding of immunised camelid-mouse serum antibodies to SARS-CoV-2 Spike protein. Absorbance measured across serial dilutions (n = 8).

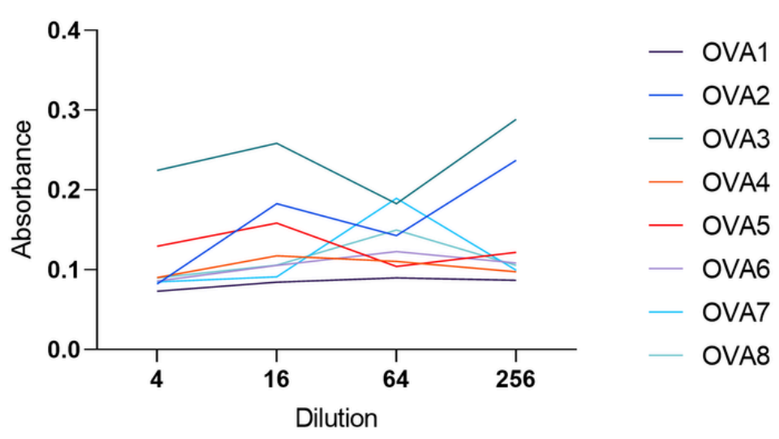


Figure 7: Off-target control binding of immunised camelid-mouse serum antibodies to Ovalbumin (OVA). Absorbance measured across serial dilutions (n = 8).

Antibody	VH	DH	JH	% SHM	CDR3	pTM
spike 1	IGHV1-71-15*01	IGHD3-2*01	IGHJ4*01	3.10%	KIIDISGYVRMDY	0.90
spike 2	IGHV1-71-15*01	IGHD3-2*01	IGHJ4*01	3.10%	KMVDISGYVTMDY	0.91
spike 3	IGHV1-71-15*01	IGHD3-2*01	IGHJ4*01	2.10%	KVIDMSGYVRMDY	0.91
spike 4	IGHV1-47-11*01	IGHD2-101	IGHJ2*01	0.70%	ARSSYYGNSFDY	0.91
spike 5	IGHV1-47-11*01	IGHD1-1*01	IGHJ2*01	0.30%	ARSDYYGSSLDF	0.91
spike 6	IGHV1-75*01	IGHV1-75*01	IGHV1-75*01	3.40%	ARSGSSSDYFDY	0.91
spike 7	IGHV1-71-15*01	IGHD3-2*01	IGHJ4*01	1.40%	KVIDISGYVRMDY	0.70
spike 8	IGHV1-71-15*01	IGHD3-2*01	IGHJ4*01	1.00%	KMIDISGYVRMDY	0.66
spike postive control	camelid	camelid	camelid		ALGVTAACSDNPYF	0.70
OVA negative control	camelid	camelid	camelid		ARRGRYDDTMDY	0.69

Table 1: V(D)J and CDR3 sequence annotation

CONCLUSION

- Figure 4 shows **favourable binding** of selected antibodies to spike protein predicted by Alpha Fold.
- Figure 6 shows that clones **Spike 1, Spike 5, and Spike 8** were the **top performing candidates** with absorbance of ~0.2 at 1:16 dilution.
- The drop in absorbance at high antibody concentrations such as 1:4 relative to 1:16 is likely due to oversaturation of antibodies from the cell culture media.
- Figure 7 does not show a standard drop, **meaning no meaningful antibody** binding is occurring as ovalbumin **was as a non-specific control protein.**
- **Future directions:** Pick VDJ sequences from heavy-chain-only antibody families 1, 5, 8 and amend the selection criteria with bioinformatic analysis of binding and protein predictions using AlphaFold.

- На рисунке 4 показано **благоприятное связывание** антигенов, предсказанное Alpha Fold.
- На рисунке 6 показано, что клоны **Spike 1, Spike 5 и Spike 8** показали **наилучшие результаты** с поглощением ~0,2 при разведении 1:16.
- Снижение оптической плотности при высоких концентрациях антител вероятно, обусловлено избыточным насыщением антителами из культуральной среды.
- На рисунке 7 не показано стандартное снижение, что означает **отсутствие значимого связывания антител**, в отличие от овальбумина, использование которого в качестве контрольного белка оказалось нерелевантным.
- **Дальнейшие исследования**: выбрать последовательности VDJ из семейств HCAB 1, 5, 8 и скорректировать критерии отбора с помощью биоинформатического анализа связывания и прогнозирования белков с использованием AlphaFold.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors extend their sincere gratitude to Lev and Alesia Levanov for providing the cells essential to this work, and to Nikita Nakazawa for collaborative efforts and contributions to this research.
Авторы выражают искренною благодарность Льву и Алесе Левановым за предоставление клеток, необходимых для данной работы, а также Никите Наказава — за сотрудничество и вклад в это исследование.