
ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫЕ АНТИТЕЛА, БЛОКИРУЮЩИЕ БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ ЧЕЛОВЕКА

© 2009 г. Г.А. Ефимов*, О.А. Вахрушева**, А.Ю. Сазыкин**, И.А. Муфазалов**,
А.А. Круглов*, Д.В. Купраш*, С.А. Недоспасов*,**

* *Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия;*

** *Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва, Россия*

Поступила: 15.01.09 г. Принята: 02.02.09 г.

На основе клонированных ДНК последовательностей высокоаффинного блокирующего мышинового моноклонального антитела против фактора некроза опухоли (ФНО) человека получено рекомбинантное одноцепочечное антитело ahT-2. AhT-2, молекулярной массой 28 кД, сохраняет способность блокировать цитотоксическую активность ФНО в биологических тестах, что в сочетании с его малыми размерами и простотой экспрессии делает его пригодным для дальнейшей биоинженерии на его основе биспецифических блокаторов ФНО.

Ключевые слова: ингибиторы ФНО, блокаторы ФНО, биспецифические блокаторы

ВВЕДЕНИЕ

Фактор некроза опухоли (ФНО), цитокин широкого спектра действия, играет важнейшую роль в формировании иммунного ответа и, с другой стороны, является одним из ключевых элементов патогенеза многих аутоиммунных заболеваний. Патогенный ФНО был обнаружен в синовиальной жидкости пациентов, страдающих ревматоидным артритом (РА) [1]. В дальнейшем роль ФНО подтвердилась в исследованиях модельных аутоиммунных заболеваний у лабораторных животных [2]. Терапия, основанная на блокировке ФНО, оказалась чрезвычайно успешной при лечении РА [3, 4]. В настоящее время целый ряд блокаторов ФНО успешно прошел клинические испытания [5–7]. Их применение одобрено не только для РА, но и для болезни Бехтерева, псориаза, псориатического артрита, болезни Крона, язвенного колита и некоторых других аутоиммунных заболеваний, в том числе и в России [8].

С другой стороны, блокировка ФНО связана с риском нежелательных побочных эффектов, которые обусловлены важными природными функциями ФНО в развитии иммунного ответа. В частности, терапия ингибиторами ФНО может приводить к реактивации латентного туберкулеза [9], развитию фармакогенной волчанки [10], повышению вероятности возникновения лимфом [11], ухудшению симптоматики ишемической болезни сердца [12]. В связи с этим, существует необходимость создания новых блокаторов ФНО, которые могли бы блокировать его действие преимущественно в очаге воспаления, оставляя защитные функции цитокина в остальном организме интактными. Несмотря на обилие различных новых блокаторов ФНО в доклинических и клинических исследованиях [13–15], шаги в этом направлении до настоящего времени не предпринимались. Данная работа ставила своей целью создание небольшого по размерам белкового агента, эффективно блокирующего ФНО. Такой блокатор может в дальнейшем послужить субъединицей в биоинженерии биспецифических ингибиторов ФНО с направленным действием.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Измерение биологической активности антитела F10

Измерения биологической активности мышиног моноклонального антитела F10 и сравнение его эффективности блокировки ФНО с эффективностью применяемых в клинике препаратов: инфликсимабом и этанерцептом проводились:

а) На культуре мышинных фибробластов линий L929 по протоколу, аналогичному описанному ранее [16]. Кратко: к монослою L929 клеток в 96-луночные планшеты добавлялся рекомбинантный ФНО человека (чФНО) и Актиномицин Д маннитол (Sigma A5156) в постоянной концентрации (охарактеризованной ранее как вызывающей гибель 95% клеток) 20 нг/мл и 4 мкг/мл соответственно, а также блокаторы чФНО, в т.ч. антитела F10, в убывающих разведениях. После инкубации в течение 24 ч к клеткам добавлялся раствор МТТ (Sigma M5655) до конечной концентрации 4 мкг/мл 16 часов спустя кристаллы формазана солюбилизировались 10% раствором додецилсульфата натрия в диметилсульфоксиде, после чего оптическая активность измерялась на микропланшетном фотометре при длине волны 540 нм с референсным значением 492 нм. Значения оптической плотности были пересчитаны на количество живых клеток.

б) В живой системе. Мышей генотипа ФНО -/- [17] внутрибрюшинно инъецировали различными дозами (10, 20, 50, 100, 200 и 500 нг/г веса) антитела F10 и инфликсимаба, а спустя 30 минут внутрибрюшинно вводили растворы D-галактозамина (Sigma G1639) и рекомбинантный чФНО в количестве 1 мг/г и 20 нг/г веса соответственно (ранее эти дозы были охарактеризованы нами как летальные для 100% мышей). В течение двух недель за мышами велось наблюдение, после чего они были забиты.

Получение Fab-фрагмента антител F10

Очищенный препарат моноклональных мышинных антител F10 был подвергнут протеолизу с помощью папаина по стандартному протоколу [18]. К 5 мг антител F10 добавляли 200 мкг лиофилизированного папаина (Sigma P4762). Протеолиз проводился в реакционном буфере, приготовленном на основе стандартного фосфатно-солевого буфера и дополнительно содержащего: 10 мМ ЭДТА (Amresco OB105), 25 мМ цистеин-гидрохлорида (Sigma C7880) при pH=7,0; в течение 4-х часов при температуре 37°C. Для остановки реакции к смеси добавляли йодоацетид (Sigma I6125) до конечной концентрации 5,5 мг/мл. Затем реакционная смесь была подвергнута диалфильтрации в микрофильтрационной ячейке (Amicon) против буфера, содержащего 100 мМ 1-замещенного фосфата натрия (Amresco O823) и 150 мМ хлорида натрия (Amresco O241) при pH=7,2. Полученный препарат, являющийся смесью Fab-фрагментов, Fc-фрагментов и папаина, был проанализирован с помощью денатурирующего электрофореза, чтобы исключить неполный протеолиз. Очистку Fab-фрагмента проводили с помощью гранулированной агарозы, конъюгированной с протеином-L (Pierce 89928) по протоколу производителя. Гомогенность полученного препарата проверяли с помощью денатурирующего электрофореза.

Конструирование и экспрессия одноцепочечного антитела ahT-2

Гены варибельных участков тяжелой и легкой цепей мышиног моноклонального антитела F10 были проклонированы нами ранее [19]. С помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) эти гены были соединены в генетическую конструкцию (рис. 1), включающую в себя С-концевой гистидиновый гексамер, участок узнавания тромбиновой протеазы и гибкий глицин-сериновый линкер. ПЦР проводилась с четырьмя

Vh домен	GGGSGGGSGGGGS	VI домен	LVPRGS	NNNNNN
	Гибкий линкер		Сайт разрезания тромбиновой протеазы	Гистидиновый гексамер

Рис. 1. Схема одноцепочечного антитела ahT-2

Варибельные участки тяжелой и легкой цепей мышиног моноклонального антитела F10 разделены пептидным линкером состава (Gly4Ser)₃. На С конце расположен гистидиновый гексамер, отделенный от гена варибельной части тяжелой цепи сайтом узнавания тромбиновой протеазы.

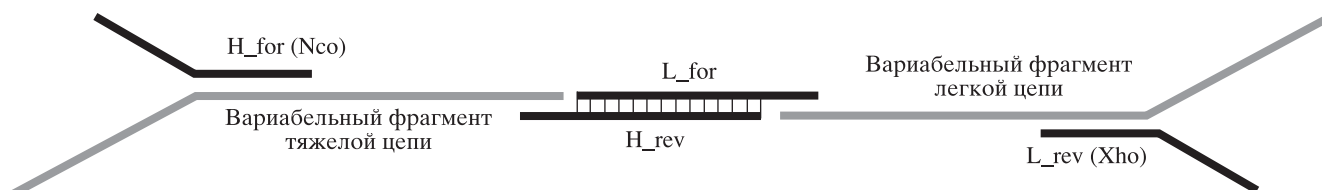


Рис. 2. Схема ПЦР, собирающей конструкцию одноцепочечного антитела

Схема ПЦР для сборки генетической конструкции одноцепочечного антитела ahT-2. На схеме изображены вариационные фрагменты тяжелой и легкой цепей, а также олигонуклеотиды H_for(Nco), L_rev(Xho), L_for и H_rev.

олигонуклеотидами-праймерами: H_for(Nco), L_rev(Xho), L_for и H_rev. H_for(Nco) своим 3' концом комплементарен 5' концу вариационной части тяжелой цепи, а на 5' конце содержит сайт эндонуклеазы рестрикции NcoI. L_rev(Xho) комплементарен 3' концу вариационной части легкой цепи, а на своем 5' конце находится сайт рестриктазы XhoI и последовательность, кодирующая сайт тромбиновой протеазы. Олигонуклеотиды L_for и H_rev комплементарны вариационным фрагментам легкой и тяжелой цепей соответственно, а за счет взаимно комплементарных участков образуют двухцепочечную последовательность, кодирующую глицин-сериновый линкер. Схема ПЦР реакции приведена на рис. 2. ПЦР с использованием полимеразы Phusion (Finnzymes, Финляндия) проводили по протоколу фирмы-производителя. Олигонуклеотиды L_for и H_rev были добавлены в реакционную смесь в концентрации 100 раз меньшей, чем остальные два олигонуклеотида. Таким образом в течение первых нескольких циклов образовывались два коротких продукта, которые в дальнейшем, когда праймеры L_for и H_rev истощались, отжигались сами на себя, производя полноразмерный фрагмент. Продукт ПЦР был подвергнут двойной рестрикции (NcoI и XhoI) и клонирован в экспрессионный вектор pET-22(b), которым затем были трансформированы клетки штамма BL21 (DE3) (Novagen). Нарастивание бактериальной культуры до оптической плотности 1.0 (при длине волны 600 нм.) проводили в бактериальном инкубаторе, в стеклянных колбах объемом 2 л, содержащих 200 мл среды 2xTY при 27°C. Для индукции транскрипции к среде добавляли Изопропил-бета-D-тиогалактозид (Anatrace I1003) в конечной концентрации 0,2 мМ и сахарозу в конечной концентрации 0,4 мМ для создания осмотического давления, увеличивающего выход растворимых одноцепочечных антител. Индукция проводилась в течение трех часов при 27°C. Бактериальная биомасса осаждалась центрифугированием при 4000 g

в течение 30 мин. при 4°C на центрифуге Eppendorf 5810 R. Осадок от 200 мл среды был собран вместе и ресуспендирован в 30 мл ледяного буфера, содержащего 20% сахарозы, 30 мМ Трис (Amresco O497) и 1 мМ ЭДТА (Amresco OB105) при pH=8,0 и инкубирован в течение часа на льду при постоянном перемешивании. После этого было проведено второе центрифугирование в течение 20 мин. при 17000 g и 4°C. Полученный таким образом супернатант содержал периплазматическую фракцию. Периплазматическая фракция была диализована против буфера, содержащего 50 мМ фосфата натрия, 300 мМ хлорида натрия (Amresco 0241) и 10 мМ имидазола (Panreac), pH=8,0 при 4°C.

Растворимый белок выделяли из периплазматической фракции и очищали с помощью металл-хелатной хроматографии по стандартному протоколу. Затем C-концевой гистидиновый гексамер удаляли протеолизом тромбиновой протеазой, конъюгированной с гранулированной агарозой (Sigma RECOMT). После этого проводили вторую металл-хелатную хроматографию для очистки препарата одноцепочечных антител от отщепленного гистидинового гексамера и от протеазы. Гомогенность полученного препарата была проверена с помощью денатурирующего электрофореза с последующей окраской серебром. Финальный белковый раствор был профильтрован через стерилизующий фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

Измерение биологической активности одноцепочечного антитела ahT-2

Определение активности полученного препарата одноцепочечных антител и сравнение с биологической активностью материнских моноклональных антител F10 и Fab-фрагмента проводили с помощью цитотоксического теста на клетках мышинной фибросаркомы линии L929, чувствительных к ФНО по протоколу, аналогичному приведенному выше.

Получение и очистка рекомбинантного чФНО

Рекомбинантный ФНО человека экспресировали в клетках *E.coli* и очищали по протоколу, опубликованному ранее [20]. Система экспрессии была любезно предоставлена Л.Н. Шингаровой (Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.В. Овчинникова РАН).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Измерение активности антител F10

На первом этапе работы мы сравнили активность мышинового моноклонального антитела F10 против ФНО человека в блокировании биологических эффектов ФНО с двумя широко применяемыми в клинике типами ингибиторов ФНО. Хотя антитело F10 было получено и охарактеризовано давно [19], ранее такого сравнения в биологических системах не проводилось. Оказалось, что F10 обладает высокой активностью в блокировке ФНО, так, в цитотоксическом тесте на линии мышины фибросаркомы L929 антитело F10 показало наивысшую эффективность блокировки ФНО среди всех протестированных нами препаратов (рис. 3).

Сравнение ингибирующих свойств блокаторов ФНО человека в мышиную систему нетривиально. Большинство блокаторов, за исключением этанерцепта, не нейтрализует ФНО мыши. В этой связи мы разрабатываем

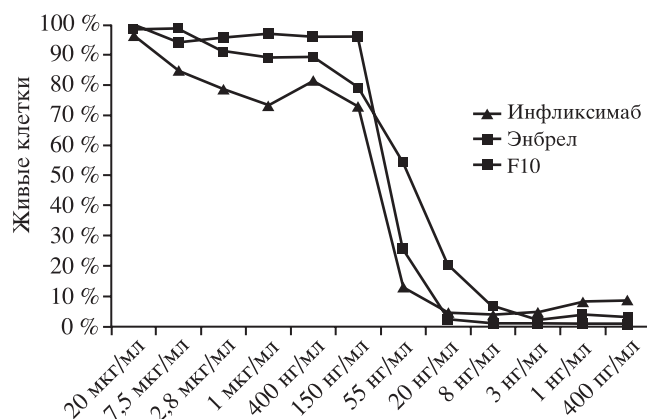


Рис. 3. Эффективность блокировки ФНО антителом F10 в культуре клеток

Определение эффективности блокирования биологической активности ФНО мышинным моноклональным антителом F10 и сравнение его эффективности с эффективностью препаратов блокаторов-ФНО этанерцептом и инфликсимабом. Приведен график зависимости выживаемости клеток линии L929 от концентрации антитела F10, этанерцепта и инфликсимаба.

различные системы «гуманизации» системы ФНО у мышей (Галимов А.Р. с соавторами [21]). В настоящей работе мы обошли эту проблему использованием нокаутных по ФНО мышей, в которых биологические эффекты (в т.ч. токсичность) вызывали инъекцией рекомбинантного ФНО человека. В живой системе антитело F10 и блокатор ФНО инфликсимаб показали приблизительно одинаковую эффективность (рис. 4). Выжили все животные, получившие максимальную дозу одного из двух этих блокаторов (приблизительно 75:1 в молярном пересчете). В минимальной дозировке (молярное соотношение 3:2) погибли все животные. Во всех других группах наблюдалась дозозависимая летальность, значительно растянутая во времени.

Конструирование одноцепочечного антитела

Для получения прототипа компактного белкового блокатора ФНО человека гены вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, проклонированные нами ранее [19], были соединены в генетическую конструкцию, кодирующую одноцепочечное антитело. Конструкция также содержала гистиридиновый гексамер для хроматографической очистки белка и сайт узнавания протеазы для удаления последнего (рис. 1). Данная генетическая конструкция, проклонированная в плазмиду pET-22(b), экспрессировалась в бактериальной системе в виде растворимых одноцепочечных

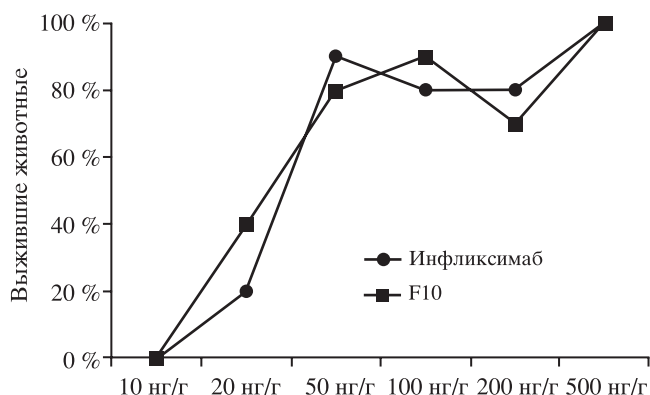


Рис. 4. Эффективность блокировки ФНО антителом F10 в живой системе

Определение эффективности блокирования биологической активности ФНО мышинным моноклональным антителом F10 и сравнение его эффективности с эффективностью препарата блокатора-ФНО инфликсимаба. Приведен график зависимости выживаемости мышей генотипа ФНО -/- от концентрации антитела F10 и инфликсимаба.

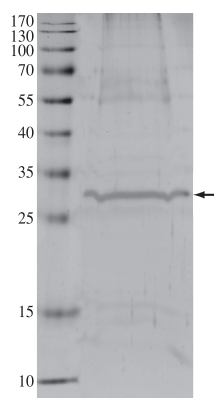


Рис. 5. Электрофореграмма белковой фракции

Электрофореграмма одноцепочечного антитела ahT-2 после очистки методом металл-хелатной хроматографии. Слева — маркеры молекулярного веса белков (Fermentas # SM0671) и соответствующие им значения молекулярного веса, справа — препарат одноцепочечного антитела (ahT-2 обозначен стрелкой). Использован набор для окраски серебром (Fermentas # K0681).

чечных антител, за счет содержащегося в плазмиде гена, кодирующего сигнальный пептид, обеспечивающий транслокацию белка в периплазму. Растворимые одноцепочечные антитела были очищены из периплазматического экстракта с помощью металл-аффинной хроматографии. Конечный препарат антител, по данным электрофореза, представлял собой очищенный белок, практически без видимых примесей, с молекулярной массой около 28 кД (рис. 5), что совпадает с молекулярной массой, предсказанной по аминокислотной последовательности.

Измерение активности одноцепочечного антитела

Измерение активности полученных одноцепочечных антител ahT-2 показало, что эти антитела эффективно блокируют биологические функции ФНО в цитотоксическом тесте (рис. 6). Следует отметить, что сравнительная активность одноцепочечных антител ahT-2 ниже, чем активность материнских моноклональных антител F10 приблизительно в 10 раз, что объясняется, по-видимому, наличием только одного участка связывания с молекулой ФНО, тогда как у полноразмерных антител таких участков два. Эта гипотеза подтверждается при сравнении активности одноцепочечных антител ahT-2 с таковой для Fab-фрагмента материнского антитела. Для этой пары разница в активности составляет приблизительно 2 раза, что может быть вполне объяснено неправильным или неоптимальным сворачиванием части молекул одноцепочечного антитела при их экспрессии в гетерологичной системе.

ОБСУЖДЕНИЕ

Терапия с использованием блокаторов ФНО сопровождается нежелательными побочными эффектами, главный из которых —

частичная потеря функций защиты организма, что может приводить к реактивации туберкулеза и других «дремлющих» инфекций. Клинические испытания многих блокаторов были проведены в странах Западной и Северной Европы, а также в Северной Америке — т.е. в развитых, не тропических странах, с хорошим уровнем практической медицины, хорошей гигиеной и низким уровнем инфекционных заболеваний, в частности, вызываемых микобактериями. В настоящее время терапия аутоиммунных заболеваний, в том числе РА, блокаторами ФНО начинает распространяться на значительно менее благополучные страны, такие как Китай, Индия, Россия, ЮАР и Бразилия. Пока эта терапия настолько дорога, что она не находит массового применения. Однако в скором времени патенты фирм-производителей этих лекарств истекнут, что приведет к появлению большого количества более дешевых заменителей заменителей, которым будут свойственны все те же недостатки. Представляется целесообразным создание более специфических блокаторов, которые не будут нейтрализовать весь ФНО в организме (в том числе, тот, который выполняет антибактериальные и иные защитные функции), а будут концентрироваться в тех тканях и органах, где и производится патогенный ФНО. Для решения этой задачи

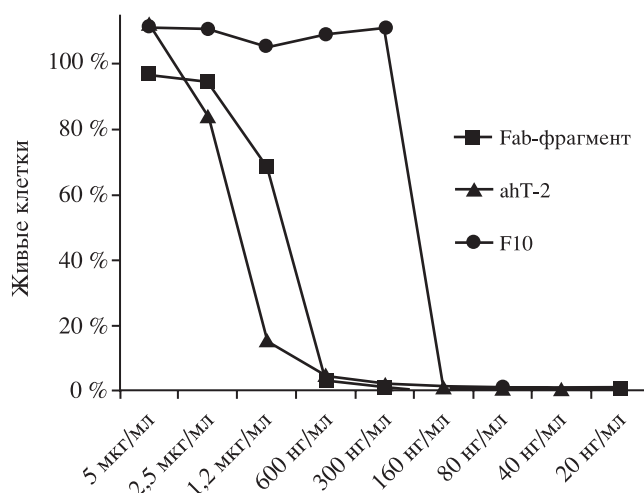


Рис. 6. Эффективность блокировки ФНО одноцепочечным антителом ahT-2 на культуре клеток

Определение эффективности блокирования биологической активности ФНО одноцепочечным антителом ahT-2 и сравнение его эффективности с эффективностью материнского мышиного моноклонального антитела F10 и Fab-фрагмента данного антитела. Приведен график зависимости выживаемости клеток линии L929 от концентрации одноцепочечного антитела ahT-2, Fab-фрагмента и антитела F10.

необходимо создать небольшие белковые модули, которые могут нейтрализовать ФНО, но при этом пригодны для дальнейшей биоинженерии. В связи с этим, стоит напомнить, что производство полноразмерных рекомбинантных антител остается достаточно сложной биотехнологической задачей.

В настоящей работе нами была создана генетическая конструкция, кодирующая одноцепочечное антитело аhT-2, оно было успешно проэкспрессировано в бактериальной системе и охарактеризовано как прототип будущего ФНО-нейтрализующего белкового модуля. Было показано, что такое антитело не только хорошо связывает ФНО человека, но и эффективно нейтрализует его в цитотоксическом тесте. Одноцепочечное антитело аhT-2 обладает достаточной биологической активностью, чтобы служить блокирующей ФНО субъединицей, в будущей биоинженерии биоспецифического анти-ФНО агента. Создание и испытание такого агента послужит принципиальным доказательством возможности направленной блокировки ФНО, и — в случае успеха — поможет создать новое поколение лекарств.

Дальнейшие исследования будут направлены на изучение фармакодинамических показателей и активности этого препарата и его производных в живых системах.

БЛАГОДАРНОСТИ

Это исследование посвящается памяти наших коллег по исследованию ФНО В.Г. Коробко, В.Н. Добрынина и Б.В. Радько, безвременно ушедших из жизни. Мы благодарны Д.А. Долгих и М.П. Кирпичникову за содействие этому проекту. Работа финансировалась из гранта РФФИ 07-04-12208.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Di Giovine F.S., Nuki G., Duff G.W. Tumour necrosis factor in synovial exudates. *Ann. Rheum. Dis.* 1988, 47(9), 768 — 772.
2. Keffer J., Probert L., Cazlaris H., Georgopoulos S., Kaslaris E. et al. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J.* 1991, 10(13), 4025 — 4031.
3. Elliott M.J., Maini R.N., Feldmann M., Long-Fox A., Charles P. et al. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum.* 1993, 36(12), 1681 — 1690.
4. Насонов Е.А. Перспективы фармакотерапии

воспалительных ревматических заболеваний: моноклональные антитела к фактору некроза опухоли-альфа. *Русский медицинский журнал* 2001, 9(7 — 8), 280 — 285.

5. Maini R.N., Breedveld F.C., Kalden J.R., Smolen J.S., Davis D. et al. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1998, 41(9), 1552 — 1563.
6. Moreland L.W., Baumgartner S.W., Schiff M.H., Tindall E.A., Fleischmann R.M. et al. Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. *N. Engl. J. Med* 1997, 337(3), 141 — 147.
7. Hanauer S.B., Sandborn W.J., Rutgeerts P., Fedorak R.N., Lukas M. et al. Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial. *Gastroenterology* 2006, 130(2), 323-333; quiz 591.
8. Насонов Е.А., Карамеев А.Е., Клюквина Н.Г. Фармакотерапия. В кн.: Ревматология: национальное руководство. Насонов Е.А., Насонова В.А., ГЭОТАР-Медиа, М 2008, 178 — 251.
9. Keystone E.C. Safety of biologic therapies-an update. *J. Rheumatol. Suppl* 2005, 74, 8 — 12.
10. Markham A., Lamb H.M. Infliximab: a review of its use in the management of rheumatoid arthritis. *Drugs* 2000, 59(6), 1341 — 1359.
11. Wolfe F., Michaud K. Lymphoma in rheumatoid arthritis: the effect of methotrexate and anti-tumor necrosis factor therapy in 18,572 patients. *Arthritis Rheum.* 2004, 50(6), 1740 — 1751.
12. Chung E.S., Packer M., Lo K.H., Fasanmade A.A., Willerson J.T. Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha, in patients with moderate-to-severe heart failure: results of the anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure (ATTACH) trial. *Circulation* 2003, 107(25), 3133 — 3140.
13. Zalevsky J., Secher T., Ezhevsky S.A., Janot L., Steed P.M. et al. Dominant-negative inhibitors of soluble TNF attenuate experimental arthritis without suppressing innate immunity to infection. *J. Immunol.* 2007, 179(3), 1872 — 1883.
14. Deng G.M., Zheng L., Chan F.K., Lenardo M. Amelioration of inflammatory arthritis by targeting the pre-ligand assembly domain of tumor necrosis factor receptors. *Nat. Med.* 2005, 11(10), 1066 — 1072.
15. Coppieters K., Dreier T., Silence K., de Haard H., Lauwereys M. et al. Formatted anti-tumor necrosis factor alpha VHH proteins derived from camels show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006, 54(6), 1856 — 1866.

16. Hogan M.M., Vogel S.N.: Measurement of Tumor Necrosis Factor α and β . In: Current Protocols in Immunology. 2000.
17. Kuprash D.V., Tumanov A.V., Liepinsh D.J., Koroleva E.P., Drutskaya M.S. et al. Novel tumor necrosis factor-knockout mice that lack Peyer's patches. Eur. J. Immunol. 2005, 35(5), 1592 – 1600.
18. Andrew S.M.: Enzymatic Digestion of Monoclonal Antibodies. In: Diagnostic and Therapeutic Antibodies. George AJT, Urch CE (eds.), vol. 40, Humana Press Inc., Totowa, NJ 2000, 325 – 331.
19. Радько Б.В., Бойченко В.Е., Негоспасов С.А., Коробко В.Г. Характеристика вариабельных генов легкой и тяжелой цепей высоко-аффинных моноклональных антител против фактора некроза опухолей человека. Russian Journal of Immunology 2002, 7(4), 371 – 374.
20. Шингарова Л.Н., Сарайдак Л.Н., Турецкая Р.Л., Негоспасов С.А., Есипов Д.С. и др. Мутанты фактора некроза опухолей человека: получение и некоторые свойства. Биоорганическая химия 1996, 22(4), 243 – 251.
21. Галимов А.Р., Круглов А.А., Большева Н.Л., Юркевич О.Ю., Лиелпньш Д.Я. и др. Определение места и характера интеграции геномного фрагмента, содержащего локус фактора некроза опухолей человека, у трансгенных мышей. Молекулярная биология 2008, 42(4), 629 – 638.

RECOMBINANT SINGLE-CHAIN ANTIBODIES INHIBITING BIOLOGICAL ACTIVITY OF HUMAN TUMOR NECROSIS FACTOR

G.A. Efimov*, O.A. Vakhrusheva**, A.Y. Sazykin**, I.A. Mufazalov**,
A.A. Kruglov*, D.V. Kuprash*, S.A. Nedospasov*, **

*Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow, Russia;

**A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, MSU, Moscow, Russia

A single-chain antibody ahT-2 was engineered based on previously cloned DNA sequences of high affinity mouse monoclonal antibody, which inhibits biological activity of tumor necrosis factor (TNF). AhT-2, with molecular weight of 28 kDa preserved the ability to inhibit cytotoxic activity of TNF in biological assays, which in combination with its small size and expression simplicity makes it suitable for further bioengineering of bispecific TNF inhibitors.