

М.В. ПАВЛОВА¹, П.В. ГІЛЬЧУК²,
Я.О. ПОХОЛЕНКО², Ю.С. НІКОЛАЄВ¹, В.А. КОРДЮМ²

¹ Київський національний університет ім. Тараса Шевченка
E-mail: mariaka@ukr.net

² Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ
E-mail: gilchuk@ukr.net

СТВОРЕННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ІМУННОЇ КОМБІНАТОРНОЇ БІБЛІОТЕКИ κДНК ВАРІАБЕЛЬНИХ ГЕНІВ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ МИШІ



Сконструйовано комбінаторну бібліотеку κДНК варіабельних генів імуноглобулінів мишей, імунізованих рекомбінантним інтерфероном β1b людини (rhIFN-β1b). Для цього ампліфіковану зі спленоцитів κДНК варіабельних генів важких (V_H) і легких (V_L) ланцюгів імуноглобулінів об'єднували лінкерною ДНК у складі послідовностей одноланцюгових антитіл — ScFv's (single-chain Fv-antibodies). Одержаний пул ScFv-ДНК було клоновано у фаг-мідному векторі і використано для трансформації *Escherichia coli*. З використанням методу фагового дисплея відібрано бактеріальні клони, які продукують специфічні до rhIFN-β1b ScFv's. У роботі встановлено такі характеристики створеної бібліотеки, як представленість, функціональний розмір та вихідне різноманіття послідовностей ScFv-ДНК. Продемонстровано високу специфічність взаємодії виділених фаговим дисплеєм ScFv's з rhIFN-β1b.

© М.В. ПАВЛОВА, П.В. ГІЛЬЧУК, Я.О. ПОХОЛЕНКО,
Ю.С. НІКОЛАЄВ, В.А. КОРДЮМ, 2008

Вступ. Новітнім підходом одержання високоспецифічних імунологічних реагентів є конструювання великих за розміром комбінаторних бібліотек κДНК варіабельних (V) генів імуноглобулінів. З таких бібліотек у подальшому можливий відбір варіантів κДНК, що кодують рекомбінантні антитіла з необхідною специфічністю та афінністю [1–3]. Конструювання комбінаторної бібліотеки передбачає селективну ампліфікацію κДНК варіабельних фрагментів важких (V_H) та легких (V_L) ланцюгів імуноглобулінів з наступним випадковим їхнім об'єднанням у складі ДНК рекомбінантних антитіл [4]. Ампліфікацію цільової κДНК проводять з використанням специфічних праймерів, які синтезують з урахуванням відмінностей первинної структури консервативних ділянок V-генів у різних видів тварин і людини.

Для ізолювання послідовностей ДНК цільових рекомбінантних антитіл проводять селекцію комбінаторної бібліотеки. Найбільш розповсюдженим методом селекції біомолекул *in vitro* є фаговий дисплей [2]. Принципом фагового дисплея є одночасне включення генів певних біолігандів (зокрема, рекомбінантних антитіл) і продуктів їхньої експресії до складу новоутворених частинок нитчастого бактеріофага у разі розвитку інфікувального процесу в *E. coli*. Рекомбінантні фаги можуть бути відібрані на іммобілізованих молекулах-мішенях і використані як у наступних циклах селекції, так і для продукування цільових рекомбінантних антитіл у клітинах прокаріотів [5]. Метод фагового дисплея дозволяє проводити цілеспрямований пошук варіантів ДНК, які кодують рекомбінантні антитіла з необхідними афінністю та специфічністю [6]. До переваг фагового дисплея можна також віднести можливість одержання рекомбінантних антитіл проти антигенів, імунізація якими ускладнена у низці випадків (аутоантигени, токсини тощо).

Найпоширенішим форматом рекомбінантних антитіл є одноланцюгові антитіла ScFv's (single-chain Fv-antibodies), які одержують трансляцією об'єднаних в один ген ДНК-послідовностей варіабельних доменів важкого (V_H) та легкого (V_L) ланцюгів імуноглобулінів. Завдяки особливостям структури ScFv's зберігають конформацію активного центру вихідного антитіла і, відповідно, високу антигензв'язувальну активність. ScFv's є зручним форматом

для конструювання фагової бібліотеки та подальшої роботи з нею [2].

На сьогодні технологія рекомбінантних антитіл набула великого практичного значення, оскільки в поєднанні з методами конструювання і селекції комбінаторних бібліотек κДНК *in vitro* дозволяє одержувати високоспецифічні імунологічні реагенти для діагностичних, лікувальних та дослідницьких потреб. Нижча собівартість порівняно із моноклональними антитілами, а також принципово нові можливості використання для терапії та діагностики різних захворювань зумовлюють значний практичний інтерес до одержання високоспецифічних ScFv's проти цільових антигенів.

Дана робота присвячена створенню та характеристиці імунної комбінаторної бібліотеки V-генів миші з метою подальшого одержання панелі ScFv's проти рекомбінантного інтерферону β1b людини (rhIFN-β1b).

Матеріали і методи. Для створення комбінаторної бібліотеки та фагового дисплея ScFv's використовували набори реактивів «Mouse Module Recombinant Phage Antibody System», «Expression Module Recombinant Phage Antibody System» («Amersham Biosciences», Швеція). В процедурах молекулярного клонування застосовували ферменти виробництва «Fermentas» (Литва) та «Sigma» (США). Для експресії клонуваних генів використовували фагмиду рCANTAB 5E («Amersham Biosciences», Швеція). Генно-інженерні маніпуляції з ДНК виконували згідно зі стандартними методами та рекомендаціями виробника відповідного набору реактивів [7].

Імунізація мишей. Для імунізації використовували самок мишей лінії BALB/c ($n = 12$) віком 2–2,5 міс. Імунізацію проводили тричі за наступною схемою, вводячи кожного разу по 80 мкг rhIFN-β1b на одну тварину: першу імунізацію здійснювали з повним ад'ювантом Фрейнда, другу – з неповним ад'ювантом, а третю – без ад'юванта. По завершенні циклу імунізації у сироватці крові мишей методом ELISA визначали титр антитіл до rhIFN-β1b. Всі маніпуляції з тваринами здійснювали з використанням седативних та анестезуючих препаратів згідно з ветеринарним законодавством.

Конструювання комбінаторної бібліотеки κДНК V-генів [8]. З використанням методу фе-

нольної екстракції із селезінок імунізованих мишей виділяли тотальну РНК [7]. Для одержання фракції полі-A(+) РНК використовували набір реактивів «mRNA Purification Kit» («Amersham Biosciences», Швеція). Синтез κДНК здійснювали в реакції зворотної транскрипції з використанням вироджених гексануклеотидних праймерів. Варіабельні послідовності важких і легких ланцюгів імуноглобулінів ампліфікували у двох окремих реакціях, використовуючи видоспецифічні праймери з набору реактивів «Mouse Module Recombinant Phage Antibody System». Розділені і очищені із 0,8%-ного агарозного гелю фрагменти V_H і V_L змішували з олігонуклеотидами, що кодують лінкерний пептид (Gly₄Ser)₃, і ампліфікували з праймерами для введення сайтів рестрикції ендонуклеаз SfiI и NotI. Отриманий продукт гідролізували відповідними рестриктазами, лігували з вектором рCANTAB 5E та використовували для трансформації *E. coli* штаму TG1.

Оцінку представленості бібліотеки проводили шляхом підрахунку індивідуальних колоній, одержаних після висіву трансформованих клітин на селективне агаризоване середовище 2YT-AG (17 г/л бактотриптону, 10 г/л дріжджового екстракту, 5 г/л NaCl, 100 мкг/мл ампіциліну, 2 % глюкози).

Селекція фагової бібліотеки [6]. Для фагового дисплея ScFv's використовували фаг-хелпер M13K07 та штам-реципієнт *E. coli* TG1 з набору реактивів «Expression Module Recombinant Phage Antibody System». Фагову бібліотеку одержували як описано у протоколах виробника набору реактивів «Expression Module Recombinant Phage Antibody System». Відбір ДНК, що кодує ScFv's необхідної специфічності, проводили методом афінної селекції фагової бібліотеки на іммобілізованому rhIFN-β1b. Селекцію здійснювали за наступною схемою: в лунку полістиролового планшета для ELISA («Nunc», Данія) вносили rhIFN-β1b в концентрації 20 мкг/мл та інкубували 12–14 год при 4 °С. Після завершення сорбції антигена планшет двічі відмивали фосфатно-сольовим буфером (PBS) і блокували місця неспецифічного зв'язування буфером PBS, який містив 0,1 % твіну 20 (PBST). Для афінної селекції в лунку вносили 10¹¹ рекомбінантних фагів у буфері PBST та інкубували 2 год при 37 °С. Про-

мивання від неспецифічно зв'язаних фагів здійснювали буферами PBST та PBS. Для елюції зв'язаних з антигеном рекомбінантних фагів використовували буфер 0,1 М гліцин-HCl, 0,5 М NaCl (рН 2,2). Елюат фагів нейтралізували розчином 2 М триса і використовували для ампліфікації в *E. coli* та наступного циклу афінної селекції.

Імуноблотинг. Елюйованими з антигена фагами інфікували клітини штаму TG1, які висівали на агаризоване середовище 2YT-AG. Імунохімічне скринування клонів проводили з використанням методу реплік колоній [9]. На поверхню нітроцелюлозної мембрани (Nybund-C Extra, «Amersham Biosciences», Швеція) наносили rhIFN- β 1b (10 мкг/мл). Місця неспецифічного зв'язування білків блокували буфером PBS, який містив 3 % знежиреного молока (PBSM). Мембрану послідовно промивали буферами PBST та PBS. Після підсушування мембрани отримували репліки колоній, які переносили на агаризоване середовище 2YT-A з 1 мМ індуктора експресії IPTG, і інкубували 10–12 год при 30 °С. Після завершення інкубації мембрану відмивали буфером PBST і вносили у буфері PBSM кон'юговані з пероксидазою хрому моноклональні антитіла проти С-кінцевої мітки ScFv's – E-tag («Amersham Biosciences», Швеція). Утворені імунні комплекси проявляли з використанням хромогенного субстрату 4-хлоро-1-нафтолу («Sigma», США).

Рестрикційний аналіз. ScFv-ДНК одержували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням праймерів pCANTAB-R1 5'-d [CCATGATTACGCCAAGCTTTGGAGCC]-3', pCANTAB-R2 5'-d [CGATCTAAA-GTTTTGTCGTCTTTCC]-3' та рекомбінантних фагмід відібраних позитивних клонів як матриці. Ампліфікацію проводили за наступних умов: 94 °С – 0,5 хв; 55 °С – 1 хв; 72 °С – 1 хв (30 циклів). Одержані продукти ПЛР (1000 п.н.) гідролізували рестриктазою MvaI і розділяли у 7%-ному поліакриламідному гелі. Візуалізацію ДНК здійснювали розчином бромистого етидію.

Експресія ScFv's в *E. coli*. Культуру нарощували при 30 °С в середовищі 2YT-AG до $A_{600} = 0,8$, індукування синтезу ScFv's здійснювали внесенням IPTG до кінцевої концентрації 1 мМ.

Продуктування ScFv's проводили за інтенсивної аерації культури протягом 14 год, по завершенню ферментації клітини осаджували центрифугуванням і використовували для одержання фракції периплазматичних білків [4].

Ферментний імуносорбентний аналіз (ELISA). В лунки полістиролового планшету для ELISA («Nunc», Данія) вносили rhIFN- β 1b (10 мкг/мл) та інкубували 1 год при 37 °С. Після блокування місць неспецифічного зв'язування білків вносили фракції периплазми, які досліджувались, та інкубували 1 год при 37 °С. Лунки промивали буфером PBST, утворені імунні комплекси проявляли кон'югованими з пероксидазою хрому анти-E-tag антитілами, як хромогенний субстрат використовували розчин ТМВ («Sigma», США). Після розвитку забарвлення реакцію зупиняли внесенням 1 М сірчаної кислоти і вимірювали величину адсорбції A_{450} на багатоканальному фотометрі Multiscan MCC/340 («Titertek», США).

Результати досліджень та їх обговорення. Якість отриманих фаговим дисплеєм ScFv's визначається такими їх характеристиками, як специфічність взаємодії з антигеном, афінність, стабільність при зберіганні, а також стабільність експресії бактеріальним продуцентом. Для відбору ScFv's з перерахованими властивостями ключовим етапом є конструювання великої за розміром і різноманіттям комбінаторної бібліотеки. Зважаючи на це, актуальним видається встановлення таких характеристик комбінаторної бібліотеки, як представленість (кількість одержаних трансформантів), функціональний розмір (відсоток клонованої кДНК, яка кодує повнорозмірний поліпептидний продукт), та вихідне різноманіття ScFv-ДНК. Останній показник визначає можливість відбору з бібліотеки панелі антиген-специфічних ScFv's з різними рівнями афінності та специфічності [10].

В даній роботі для синтезу кДНК V-генів і конструювання комбінаторної бібліотеки використовували мРНК з селезінок двох імунних мишей з найвищим титром специфічних антитіл у сироватці крові (1 : 500 000). Оскільки імунна бібліотека є збагаченим джерелом послідовностей цільових V-генів, імовірність виділення панелі високоафінних ScFv's проти rhIFN- β 1b є достатньо високою. Перевагою зазначеного під-

ходу також є те, що при роботі з імунованими тваринами відсутня необхідність генерування великої за розміром комбінаторної бібліотеки. Представленість отриманої нами бібліотеки склала $\sim 5 \cdot 10^5$ незалежних клонів.

Наступним етапом було визначення функціонального розміру бібліотеки. Фагмідну ДНК випадково відібраних клонів використовували як матрицю для ампліфікації ScFv-ДНК. Було показано, що 30 % серед проаналізованих рекомбінантних фагмід ($n = 15$) містять повнорозмірні варіанти ScFv-ДНК, у той час як інші клоновані фрагменти мали меншу молекулярну масу (рис. 1). Конструкція фагміди pCANTAB 5E передбачає введення послідовностей ДНК лідерного пептиду і С-кінцевого фрагменту E-tag, які фланкують кодуєчу частину гена ScFv's по сайтах рестрикції SfiI і NotI. Оскільки при індукуванні промотору *lac* фагміди ScFv's секретуються у периплазму *E. coli*, за допомогою моноклональних анти-E-tag антитіл можливо визначати їхню експресію. За результатами імуноблотингу було встановлено, що ~ 40 % серед проаналізованих клонів бібліотеки ($n = 362$) продукують ScFv's з послідовністю E-tag (результати не представлено). Враховуючи наведені результати можна зробити висновок, що сконструйовано імунну комбінаторну бібліотеку κДНК V-генів миші з використанням достатньо ефективної схеми клонування.

Різноманітність V-генів, представлених у бібліотеці, оцінювали гідролізом повнорозмірних ампліконів ScFv's ($n = 5$) рестриктазою MvaI. Зазначений метод досить часто використовується для виявлення відмінностей у первинній структурі індивідуальних генів ScFv's [11]. Важливо зазначити, що для кожної з проаналізованих нами послідовностей спостерігалися унікальні набори фрагментів рестрикції (рис. 2), що свідчить про високу різноманітність вихідної бібліотеки.

Високий титр специфічних антитіл у сироватці крові імунованих тварин, високі показники представленості, функціонального розміру та вихідного різноманіття ScFv-ДНК комбінаторної бібліотеки дозволяють сподіватись на одержання панелі ScFv's проти rhIFN-β1b.

Для селекції комбінаторної бібліотеки нами було використано метод фагового дисплея.

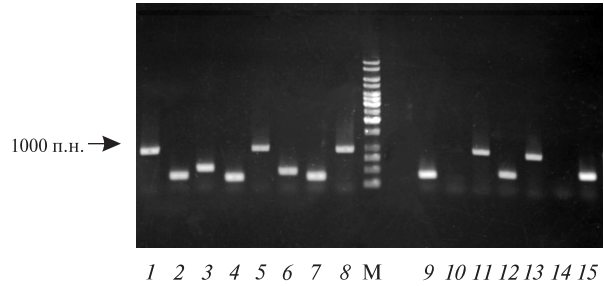


Рис. 1. Електрофореграма розділення в 0,8%-ному агарозному гелі фрагментів ScFv-ДНК, одержаних ампліфікацією з випадково відібраних клонів ($n = 15$) вихідної бібліотеки (доріжки 1–15); М – маркер молекулярної маси ДНК (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, «Fermentas»)

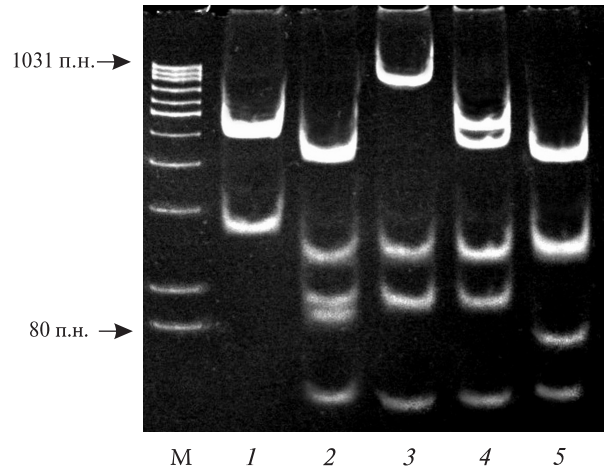


Рис. 2. Електрофореграма розділення в 7%-ному поліакриламідному гелі фрагментів рестрикції, одержаних гідролізом рестриктазою MvaI повнорозмірної ScFv-ДНК ($n = 5$) із вихідної бібліотеки (доріжки 1–5); М – маркер молекулярної маси ДНК (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, «Fermentas»)

Основною перевагою фагового дисплея є можливість спрямованої селекції κДНК, що кодує специфічні до цільового антигена ScFv's. Це досягається шляхом афінного зв'язування експонованих на поверхні фага ScFv's з іммобілізованим антигеном і наступної ампліфікації цих фагів в *E. coli*. Важливим етапом при проведенні афінного збагачення бібліотеки є розробка правильної стратегії селекції, оскільки вибіркова ампліфікація певних фагів може привести до втрати вихідного різноманіття цільових послідовностей і/або виділення ScFv's з низькими константами афінності. У даній

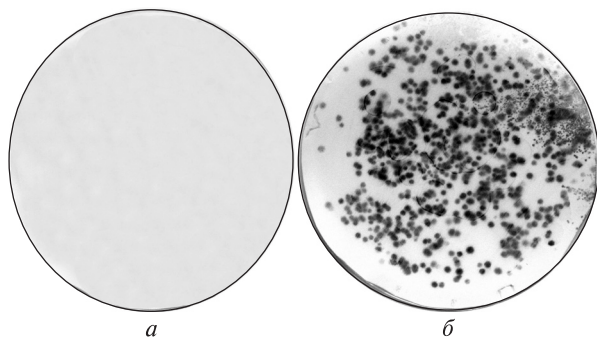


Рис. 3. Імуноблоти реплік бактеріальних колоній, одержані в результаті скринування трансформантів вихідної бібліотеки (а) і клонів, отриманих після двох циклів афінної селекції фагової бібліотеки на іммобілізованому rhIFN-β1b (б). Кількість колоній на кожній із реплік становить відповідно ~10 000 та 700

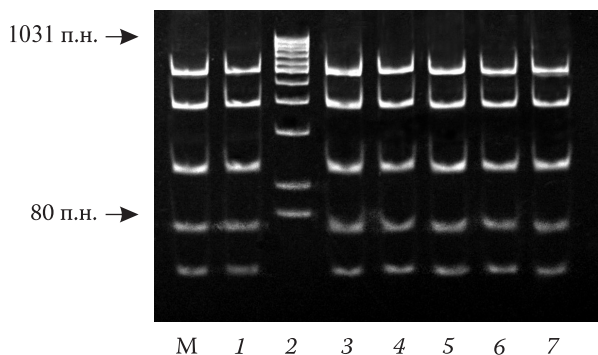


Рис. 4. Електрофореграма розділення в 7%-ному поліакриламідному гелі фрагментів рестрикції, одержаних гідролізом ДНК специфічних до rhIFN-β1b ScFv's ($n = 7$) рестриктазою MvaI (доріжки 1–7); М – маркер молекулярної маси ДНК (GeneRuler100 bp DNA Ladder, «Fermentas»)

роботі застосовували елюцію зв'язаних фагів з поверхні іммобілізованого rhIFN-β1b за кислих умов (рН 2,2), яку проводили у кожному із двох послідовних циклів афінного збагачення бібліотеки. Метою використання наведених умов селекції бібліотеки було одержання ScFv's з високими показниками специфічності і стабільності, а також відсутністю негативного впливу на продуцент при експресії.

Ефективність збагачення бібліотеки визначали за відсотком бактеріальних клонів, які продукують специфічні до rhIFN-β1b ScFv's. Для цього за допомогою методу імуноблотингу аналізували репліки колоній вихідної та збагаченої бібліотеки (рис. 3). Серед 10^4 про-

аналізованих клонів вихідної бібліотеки не виявлено продуцентів ScFv's, специфічних до rhIFN-β1b (рис. 3, а), що, з урахуванням представленості бібліотеки і можливості елімінації деяких послідовностей, дозволяє очікувати на невисоку різноманітність панелі цільових ScFv's. Після проведення двох послідовних циклів селекції показано, що понад 95 % проаналізованих клонів ($n = 700$) продукують ScFv's проти rhIFN-β1b (рис. 3, б).

За результатами імуноблотингу із збагаченої бібліотеки випадковим чином було відібрано 30 позитивних клонів для подальшого аналізу. Методом ELISA підтверджено продукування специфічних до rhIFN-β1b ScFv's у периплазму та культуральне середовище всіма одержаними клонами. Високу специфічність зв'язування всіх виділених ScFv's з rhIFN-β1b було продемонстровано в ELISA з використанням як антигенів rhIFN-β1b та rhIFN-β2b (результати не представлено), ступінь гомології амінокислотних послідовностей яких становить ~40 % [12].

Різнорозмірність ScFv-ДНК одержаних продуцентів оцінювали рестрикцією MvaI за схемою, яка описана вище. Електрофоретичний аналіз фрагментів рестрикції показав відсутність гетерогенності серед проаналізованих варіантів ScFv's ($n = 7$) (рис. 4), однак встановлення відмінностей первинної структури варіабельних доменів можливе лише у разі повного сіквенування їхньої ДНК.

Висновки. Сконструйовано імунну комбінаторну бібліотеку кДНК V-генів миші з характеристиками, які дозволяють сподіватись на отримання панелі високоафінних ScFv's проти rhIFN-β1b. З використанням двох циклів афінної селекції фагової бібліотеки ізольовано бактеріальні продуценти цільових ScFv's, які планується використовувати у подальших роботах. Для виділених ScFv's показано високу специфічність взаємодії з rhIFN-β1b.

SUMMARY. A cDNA combinatorial antibody library of mouse variable immunoglobulin fragments has been constructed from mice immunized with rhIFN-β1b. For this purpose, cDNAs of immunoglobulin variable heavy (V_H) and variable light (V_L) chains genes amplified from splenocytes were joined with linker DNA to form ScFv's (single-chain Fv-antibodies). The obtained ScFv-DNA pool was cloned into a phagemid vector and used for *Escherichia coli*

transformation. Using the phage display technique, bacterial clones producing single-chain antibodies specific to rhIFN-β1b were selected. The following characteristics of the combinatorial library were determined in this work: abundance, functional size, and the initial ScFv-DNA diversity in the library constructed. High specificity of interaction between phage displayed ScFv's and rhIFN-β1b has been demonstrated.

РЕЗЮМЕ. Была сконструирована комбинаторная библиотека κДНК переменных генов иммуноглобулинов мышей, иммунизированных рекомбинантным интерфероном β1b человека (rhIFN-β1b). Для этого амплифицированную из спленоцитов κДНК переменных генов тяжелых (V_H) и легких (V_L) цепей иммуноглобулинов объединили линкерной ДНК в составе последовательностей одноцепочечных антител – ScFv's (single-chain Fv-antibodies). Полученный пул ScFv-ДНК был клонирован в фагмидный вектор и использован для трансформации клеток *Escherichia coli*. С использованием метода фагового дисплея отобраны бактериальные клоны, которые продуцируют специфические к rhIFN-β1b одноцепочечные антитела. В работе определены такие характеристики созданной библиотеки, как представленность, функциональный размер, а также исходное разнообразие последовательностей ScFv-ДНК. Продемонстрирована высокая специфичность взаимодействия ScFv, выделенных с помощью фагового дисплея, с rhIFN-β1b.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Moroney S., Pluckhun A. Modern antibody technology : The impact on drug development // Modern Biopharmaceuticals / Eds J. Knablein. – Weinheim : Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, 2005. – 4. – P. 1147–1186.
2. Bradbury A., Marks J.D. Antibodies from Phage antibody libraries // J. Immun. Meth. – 2004. – 290. – P. 29–49.
3. Sblattero D., Bradbury A. Exploiting recombination in single bacteria to make large phage antibody libraries // Nat. Biotechnol. – 2000. – 18, № 1. – P. 75–80.
4. Pope A.R., Embleton M.J., Mernaugh R. Construction and use of antibody gene repertoires // Antibody Engineering / Eds J. McCafferty, H.R. Hoogenboom, D.J. Criswell. – Oxford : IRL Press at Oxford University Press, 1996. – 10. – P. 1–40.
5. Pluckthun A., Krebber A., Krebber C., Horn U., Knupfer U., Wenderoth R., Nieba L., Proba K., Riesenberg D. Producing antibodies in *Escherichia coli* : from PCR to fermentation // Antibody Engineering / Eds J. McCafferty, H.R. Hoogenboom, D.J. Criswell. – Oxford : IRL Press at Oxford University Press, 1996. – 10. – P. 203–252.
6. Coomber D.W.J. Panning of antibody phage-display libraries : Standard protocols // Methods in Molecular Biology. Antibody Phage display : Methods and Protocols / Eds P.M. O'Brien, R. Aitken – Totowa : Humana Press Inc., 2002. – 178. – P. 133–145.
7. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning : A laboratory manual. – Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
8. Lennard S. Standard protocols for the construction of ScFv libraries // Methods in Molecular Biology. Antibody Phage display : Methods and Protocols / Eds P.M. O'Brien, R. Aitken – Totowa : Humana Press Inc., 2002. – 178. – P. 59–71.
9. Skerra A., Dreher M.L., Winter G. Filter screening of antibody Fab fragments secreted from individual bacterial colonies : specific detection of antigen binding with a two-membrane system // Anal. Biochem. – 1991. – 196, № 1. – P. 151–155.
10. De Haard H.J., Neer N., Reurs A., Hufton S.E., Roovers R.C., Henderikx P., de Bruine A.P., Arends J.W., Hoogenboom H.R. A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies // J. Biol. Chem. – 1999. – 274, № 26. – P. 18218–18230.
11. Окунев О.В., Гильчук П.В., Иродов Д.М., Дерябина Е.Г. Получение и характеристика одноцепочечных антител к интерферону α2b человека // Укр. біохім. журн. – 2005. – 77, № 5. – С. 106–115.
12. Karpusas M., Whitty A., Runkel L., Hochman P. The structure of human interferon-beta: implications for activity // Cell Mol. Life Sci. – 1998. – 54, № 11. – P. 1203–1216.

Надійшла 03.05.07