

Auglių nekrozės faktorius (TNF - *tumor necrosis factor*) yra citokinas, kuris dalyvauja sukeldamas uždegimą. Išskiriamas daugiausia makrofagų, bet taip pat ir limfocitų, endotelio ląstelių, adipozinio audinio ląstelių, širdies miocitų, nervinio audinio ląstelių. Padidėjusi TNF koncentracija sukelia pagrindinius uždegimo požymius: karščiavimą, tinimą, paraudimą ir skausmą. TNF skatinamas uždegiminis atsakas gali sukelti daug sveikatos problemų, susijusių su autoimuniniais sutrikimais – reumatoidinį artritą, ankilozinį spondilitą, Crohn'o ligą, psoriazę, bronchinę astmą. Tyrimai parodė, jog, užblokavus TNF, pacientų būklė pagerėja. Šias ligas galima gydyti panaudojant TNF inhibitorius, kurių vaidmenį puikiai galėtų atlikti TNF surišantys antikūnai.

Monokloniniai antikūnai tampa vis populiareniais įrankiais analitiniuose ir diagnostiniuose metoduose, taip pat ir vis reikšmingesne terapine priemone. Tačiau antikūnų praktinį pritaikymą apsunkina jų imunogeniškumas, sudėtingas ir brangus jų gavimas, nepageidaujamas biologinis aktyvumas, ribotas afiniškumas bei sugebėjimas įsiskverbti į audinius (Zola et al., 1995).

Siekiant šias problemas išspręsti yra kuriami rekombinantiniai antikūnai. Norint išvengti imunogeniškumo naudojami chimeriniai (IgG žmogaus, o Fab fragmentas – iš pelių), humanizuoti (iš pelės yra jau tik CDR rajonas) antikūnai. Antikūnų fragmentai Fab, Fv gali taip pat jungtis prie antigeno kaip jų „tėvinės“ molekulės, net jei afiniškumas ir sumažėja. Tačiau, skirtingai nuo „tėvinių“ molekulių, jie lengvai produkuojami bakterijose. Fab fragmentai produkuojami kaip sunkiosios ir lengvosios grandinės, sujungtos per CL ir CH1 domenus, o Fv fragmentai efektyviai nesusijungia. Šios problemos sprendimas – vienagrandžių antikūnų konstravimas (Smith et al., 2004).

Rekombinantiniai vienagrandžiai antikūnai – tai maži baltymai, sudaryti iš variabiliųjų lengvosios ir sunkiosios grandinių domenų, paprastai sujungtų lanksčiu peptidiniu jungtuku, todėl juos galima efektyviai ekspresuoti *E. coli* ekspresijos sistemose. vFv antikūnai yra mažesni nei IgG, F(ab')₂ ar Fab molekulės, todėl greičiau difunduoja ir geriau įsiskverbia į audinius, tarp jų ir vėžinius (Fang et al., 2003; Laroche et al., 1991). Be to, jie neturi Fc domeno, todėl yra mažiau imunogeniški, o taip pat negali jungtis prie Fc receptorių, išsidėsčiusių normalių ląstelių paviršiuje. Šios savybės viengrandžius antikūnus paverčia potencialiai tinkamais diagnostikai ir terapijai, toksinų ir kitų molekulių surišimui.

Šio darbo metu iš hibridomų ląstelių sėkmingai izoliuoti antikūnų prieš TNF molekulę sunkiosios ir lengvosios grandinės genai. Jie sėkmingai sulieti ir klonuoti į pET21b(+) ir pET22b(+) ekspresijos vektorius, leidžiančius ekspresuoti didelį baltymo kiekį. Pabandžius baltymą ekspresuoti standartinėse *E. coli* augimo sąlygose, paaiškėjo, kad gaminamas didelis baltymo kiekis, tačiau baltymas agreguoja į intarpinius kūnelius. Modifikuojant auginimo bei indukcijos sąlygas tirpumo pagerinti nepavyko.

Vienagrandį anti-TNF antikūną koduojantis genas buvo sujungtas su 269 bp ilgio seka, koduojančia signalinį peptidą, nukreipiantį baltymą į augimo terpę, ir klonuotas į mielių ekspresijos vektorių pFGG3 po *GAL7* galaktoze indukuojamu promotoriumi. Mielėse *S. cerevisiae* gauta baltymo ekspresija, tačiau jis visas randamas netirpioje ląstelės baltymų frakcijoje ir tolimesnė šio baltymo sekrecija nevyksta.