



УДК 577.112.083.3:548.737

ПОЛУЧЕНИЕ, КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ И ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ Fab-ФРАГМЕНТА МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА К ИНТЕРЛЕЙКИНУ-2 ЧЕЛОВЕКА И ЕГО КОМПЛЕКСА С АНТИГЕННЫМ ПЕПТИДОМ

© 1999 г. И. Ю. Михайлова, Т. Ю. Мареева, И. Н. Цыганник, И. И. Михалева, Л. В. Оноприенко, А. А. Вихров, Е. А. Марквичева, В. Пэнгбори*, В. Дюэкс*, В. А. Несмеянов, В. З. Плетнев[#]

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

* Медицинский исследовательский центр им. Хауптмана – Вудвард, Буффало (Нью-Йорк), США

Поступила в редакцию 24.06.98 г.

Принята к печати 06.08.98 г.

С использованием усовершенствованной методики проведена препаративная наработка гомогенных по изоэлектрической точке антигенсвязывающих фрагментов (Fab) мышинных моноклональных антител к интерлейкину-2 человека. В различных кристаллических формах получены пригодные для рентгеноструктурных исследований монокристаллы Fab-фрагментов в свободной форме и в комплексе с антигеном – пептидным фрагментом 59-72 интерлейкина-2. Проведены предварительные рентгеноструктурные исследования полученных кристаллов.

Ключевые слова: интерлейкин-2; моноклональное антитело; Fab-фрагмент; кристаллизация; рентгеноструктурный анализ.

Антитела, в первую очередь моноклональные, находят широкое применение в научных исследованиях и биотехнологии, что обусловлено их уникальной специфичностью, которая обеспечивается пространственной комплементарностью антигена и антигенсвязывающего центра антитела и образованием в контактной области системы стабилизирующих водородных связей, электростатических и гидрофобных взаимодействий [1–3]. Результаты рентгеноструктурных исследований антигенсвязывающих фрагментов антител (Fab) показали, что характер комплекса в основном зависит от природы антигена. При этом возможно как глубокое погружение антигена в щель активного центра, характерное для гаптенных, так и поверхностное взаимодействие, имеющее место для белковых антигенов. Большинство полученных к настоящему времени данных касается структуры комплексов антител с неприродными гаптенами [1, 3]. Информация о строении комплексов антител с белками и особенно с пептидами весьма ограничена, и этот вопрос до сих пор вызывает значительный интерес. Исследования подобных комплексов важны для создания синтетических вакцин. Обоснованный выбор В-клеточных эпителиев может базироваться лишь на большом объеме экспериментальных данных о стереохимичес-

ких особенностях, селективности и аффинности связывания пептидов с антителами. В частности, широко дискутируется вопрос, положительным или отрицательным фактором для высокоаффинного взаимодействия с антителом является конформационная подвижность пептида [3].

Цель проводимого исследования – установление методом рентгеноструктурного анализа на атомном уровне разрешения пространственной структуры Fab-фрагмента моноклонального антитела (МА) LNKВ-2 [4] к интерлейкину-2 (IL-2) человека и его комплекса с пептидным фрагментом этого цитокина, к которому оно специфично. Ввиду того, что пространственная структура IL-2 известна [5, 6], выяснение структуры комплекса Fab-фрагмента с пептидом позволит установить тонкие структурные изменения, происходящие при связывании антигена антителом.

Интерлейкин-2 – один из главных регуляторов иммунной системы, отвечающий за рост и дифференцировку активированных антигеном Т- и В-лимфоцитов [7]. Он рассматривается как перспективное терапевтическое средство при вторичных иммунодефицитах. МА LNKВ-2 было получено к рекомбинантному IL-2, однако оно взаимодействует с высокой аффинностью ($K_{св} \sim 3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) и с природным цитокином. Как показано [4, 8], эпитоп МА LNKВ-2 локализован в центральной части молекулы IL-2 в пептидном фраг-

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 330-75-10, e-mail: pletnev@amber.siocb.ras.ru).

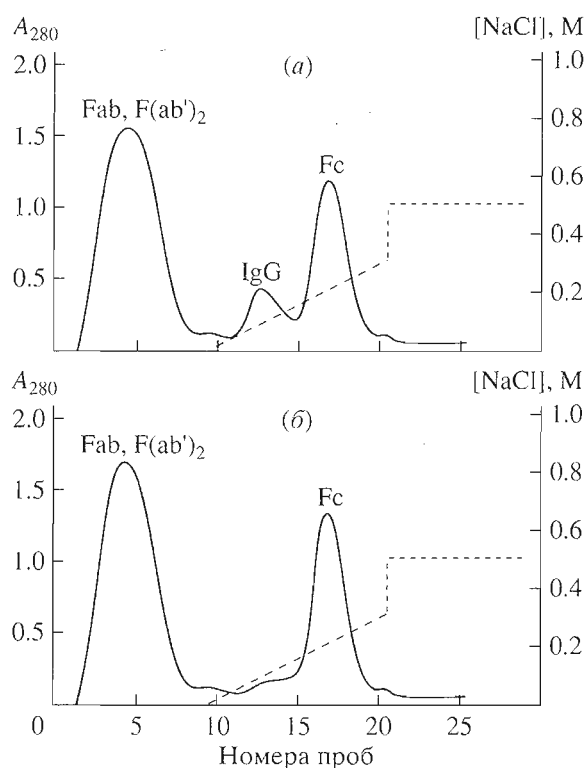


Рис. 1. Ионообменная хроматография на DEAE-целлюлозе продуктов расщепления МА LNKВ-2 папаином в присутствии 3 мМ цистеина (а) и 25 мМ меркаптоэтанола (б). Fab, F(ab')₂ – мономерный и димерный антигенсвязывающие фрагменты, IgG – нерасщепившееся антитело, Fc – константная часть антитела (условия см. “Эксперимент. часть”).

менте 59-72 [4, 8]. Дальнейшее исследование методом ЯМР взаимодействия МА LNKВ-2 с пептидами различной длины из этой части молекулы IL-2 выявили, что основной вклад в связывание вносят метильные группы остатков Leu66, Leu70, Leu72, Val69 и Ala73, т.е. взаимодействие IL-2 – антитело имеет гидрофобный характер [9]. Первичная структура переменных областей легкой и тяжелой цепей МА LNKВ-2 была установлена по структуре гена [10]. В то же время никаких данных о пространственной структуре самого антитела получено не было ввиду большого размера молекулы.

На первом этапе необходимо было подобрать условия получения и кристаллизации Fab-фрагментов МА LNKВ-2 и оценить пригодность полученных кристаллов для последующего рентгеноструктурного анализа, чему и посвящена настоящая работа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рентгеноструктурные исследования белков предъявляют высокие требования к качеству кристаллов. Поэтому первой важной задачей яв-

ляется препаративная наработка высокоочищенного белкового объекта.

Наработку МА в значительных количествах обычно осуществляют в асцитах мышей, но при этом МА может оказаться загрязнено собственными иммуноглобулинами мыши, что в свою очередь существенно затруднит получение качественных кристаллов. Удаление этих неспецифических антител может быть достигнуто с помощью аффинной хроматографии на иммобилизованном антигене к целевому белку, однако, как показывает практика, приготовленные из таких антител и элюированные затем с аффинного сорбента Fab-фрагменты часто не пригодны для кристаллизации.

В данном исследовании апробированы две возможности наработки МА LNKВ-2 – в асцитах мышей и культивированием *in vitro* в бессывороточной среде гибридомы, инкапсулированной в гранулы композитного поливинилкапролактан-альгинатного (ПВК-альгинатного) гидрогеля [11]. Дальнейшая очистка МА проводилась по описанной методике осаждением МА каприловой кислотой и удалением остающихся примесей на DEAE-целлюлозе [12]. В результате были получены гомогенные по данным SDS-электрофореза в ПААГ препараты МА LNKВ-2. Активность антител оценивали методом твердофазного иммуоферментного анализа [4].

МА, наработанные как из асцита, так и из культуральной среды были пригодны для выращивания качественных кристаллов. Критической стадией оказалось получение Fab-фрагментов МА. Расщепление антител папаином – хорошо известная и широко используемая для этих целей процедура, однако конкретные условия протеолиза зависят от субкласса IgG и от качества препарата используемого папаина [13]. Расщепление МА папаином в присутствии 3 мМ цистеина по предлагаемой ранее методике [14] приводило к образованию, как показывали данные SDS-электрофореза (не приведены), димерных F(ab')₂ фрагментов [15] с *M* ~100 кДа наряду с требуемым мономерным продуктом с *M* ~50 кДа (рис. 1а), что существенно усложняло методику последующей очистки. При этом также не происходило полного расщепления исходных антител, независимо от времени реакции и весового соотношения папаина и антител. Проведение процедуры расщепления МА папаином в присутствии 25 мМ меркаптоэтанола по методике [16] привело к увеличению выхода Fab-фрагмента; при этом практически не наблюдалось присутствия нерасщепившихся антител (рис. 1б) и образования димерных фрагментов.

После проведения хроматографии на DEAE-целлюлозе по стандартной методике [16] продукт был индивидуален по данным SDS-электрофореза

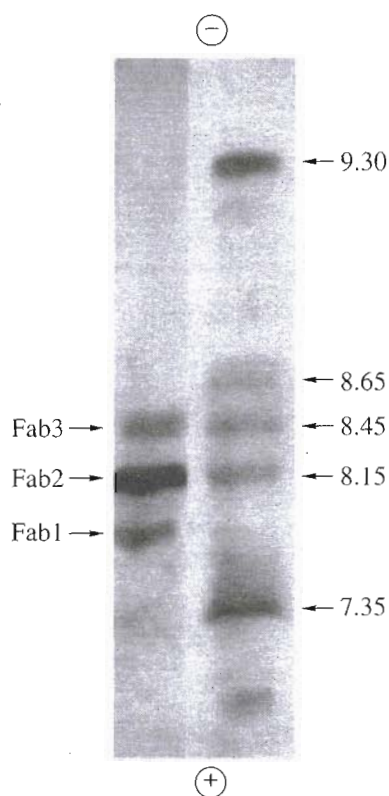


Рис. 2. Аналитическое изоэлектрофокусирование в ПААГ фракции, содержащей Fab-фрагменты (рис. 1б). Справа – дорожка маркеров (Broad pI Calibration Kit). Представлена часть геля диапазона рН 3.5–9.5.

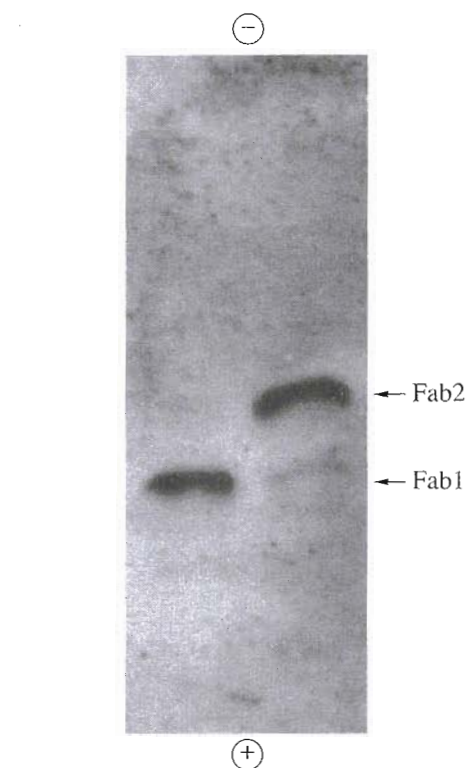


Рис. 3. Аналитическое изоэлектрофокусирование фракций Fab-фрагментов, полученных после препаративного изоэлектрофокусирования. Показана часть геля диапазона рН 3.5–9.5.

за, но результаты аналитического изоэлектрофокусирования (рис. 2) показали наличие трех изоформ Fab-фрагментов с pI 7.8, 8.1 и 8.5 (обозначаемых в дальнейшем как фракции Fab1, Fab2 и Fab3, соответственно) с преимущественным содержанием Fab2. Для разделения фракций использовался метод препаративного изоэлектрофокусирования в гранулированном геле Ultrodex в градиенте рН 7–9.5. При этом были получены гомогенные фракции с pI 7.8 и 8.1 (Fab1 и Fab2, рис. 3); фракция Fab3 присутствовала в незначительном количестве. Белки фракций Fab1 и Fab2 после диализа и концентрирования использовали для получения кристаллов свободных Fab-фрагментов и их комплексов с синтетическим пептидным фрагментом 59-72 IL-2, являющимся эпитопом данного антитела [8].

Кристаллизацию проводили методом диффузии через газообразное состояние в вариантах “висячей” и “сидячей” капли с использованием высаживающих противорастворов различного состава. Варьировали концентрации белка и высаживающих агентов, рН растворов, содержание различных добавок, объем белковых проб. Попытка исключить из процедуры очистки Fab-фрагментов стадию препаративного изоэлектро-

фокусирования приводила к плохой воспроизводимости кристаллической формы № 1 (таблица), получаемой из смеси фракций фрагментов. Поэтому дальнейший поиск и оптимизацию условий кристаллизации проводили только с фракциями гомогенных препаратов Fab1 и Fab2 (таблица, кристаллические формы № 2–8).

В результате были получены монокристаллы свободных фрагментов и комплекса Fab с антигенным пептидом. Образование комплекса (таблица, кристаллическая форма № 8) контролировалось методом твердофазного иммуноферментного анализа [4]; в найденных условиях МА LNKВ-2 полностью сохраняло способность к взаимодействию с этим пептидом. Косвенным подтверждением образования комплекса при сокристаллизации Fab2 с пептидом является также увеличение на 1.4% объема его кристаллической ячейки по сравнению с ячейкой свободного фрагмента, полученных при практически идентичных условиях (таблица, ср. с кристаллическими формами № 7, 8). Наиболее пригодные для рентгеноструктурного анализа кристаллы (таблица, № 5–8) имели пластинчатую форму с отчетливо выраженными гранями. Они характеризовались ромбической пространственной группой $P2_12_12_1$ и максимально

Условия получения и параметры кристаллов Fab-фрагментов моноклонального антитела LNKВ-2 к интерлейкину-2

Препарат	№ кристаллической формы	Кристаллизационный раствор	Пространственная группа и параметры кристаллической ячейки*	Разрешение, Å
Смесь фракций Fab1, Fab2 и Fab3	1	11–13% ПЭГ-6000, 0.1 М NaCl, 0.02% NaN ₃ , 0.1 М NaAc (рН 5.6–6.1)	$P4_12_12(P4_32_12)$ $a, b 155.9, c 49.6;$ $Z 8$	~5
Fab1 (рН ~ 7.8)	2	8–13% ПЭГ-8000, 0.1 М ZnAc, 50 мМ Na-какодилат (рН 6.5)	$P2_12_12_1$ $a 42.56, b 90.64, c 139.78;$ $Z 4$	~4
Fab2 (рН ~ 8.1)	3	12–14% ПЭГ-4000, 6% (по объему) 2-пропанол, 60 мМ Na-HEPES (рН 7.3–7.8)	$P2_1$ $a 74.7, b 68.0, c 47.2\text{Å}; \beta 110.2;$ $Z 2$	~4
	4	12–14% ПЭГ-4000, 60 мМ Na-цитрат (рН 5.6)	$P1$ $a 48.0, b 48.3, c 75.1;$ $\alpha 69.4, \beta 99.3, \gamma 133.8;$ $Z 1$	~3.5
	5	11–12% ПЭГ-8000, 130–140 мМ ZnAc, 0.02% NaN ₃ , 60 мМ Na-какодилат (рН 6.5)	$P2_12_12_1$ $a 42.78, b 90.78, c 139.97;$ $Z 4$	2.9
	6	12–14% ПЭГ-4000, 6–7% (по объему) 2-пропанол, 60 мМ Na-HEPES (рН 7.4–7.9)	$P2_12_12_1$ $a 72.52, b 72.24, c 87.18;$ $Z 4$	2.9
	7	13–14% ПЭГ-4000, 13–14% (по объему) 2-пропанол, 60 мМ Na-цитрат (рН 5.6)	$P2_12_12_1$ $a 72.09, b 72.16, c 87.01;$ $Z 4$	2.7
Fab2 + пептид	8	12–13% ПЭГ-4000, 12–13% (по объему) 2-пропанол, 60 мМ Na-цитрат (рН 5.6)	$P2_12_12_1$ $a 71.94, b 72.22, c 88.33;$ $Z 4$	2.6

* Параметры a, b, c приведены в Å, α, β, γ – в градусах.

возможным разрешением выше 3 Å. Самыми качественными из полученных оказались кристаллы комплекса Fab2 с пептидным фрагментом IL-2, представляющие наибольший научный интерес.

Полученные в настоящей работе результаты закладывают необходимую основу для установления на атомном уровне пространственной структуры Fab-фрагмента МА LNKВ-2 к IL-2 и его комплекса с антигенным пептидом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы: альгинат натрия, полилизин (M_r 70 000–150 000), SPITE (добавка для бессывороточного культивирования), 2,4,10,14-тетраметилпентадекан, папаин (удель-

ная активность 20 ед/мг) – Sigma, США; гранулированный гель Ultrodex, амфолины – LKB, Швеция; среды: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), NMHF (Nutrient Mixture Ham's F12) – Gibco, Шотландия; DEAE-целлюлоза DE-52 – Whatman, Великобритания.

Иммобилизация и культивирование гибридомы LNKВ-2. Готовили иммобилизационную смесь следующего состава: 40 мл 4% альгината натрия, 20 мл 7% ПВК, 60 мл суспензии клеток (1.2×10^8 клеток). Полученную смесь добавляли по каплям в 2% раствор CaCl₂, подогретый до 37–40°C. Гранулы с клетками выдерживали в растворе хлорида кальция 5 мин, дважды отмывали физиологическим раствором и далее обрабатывали в течение 5 мин физиологическим раствором, со-

державшим 0.02% полилизина, также предварительно подогретым до 37–40°C. Затем гранулы дважды отмывали физиологическим раствором, один раз средой DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, и переносили в 1-литровый спиннер с 350 мл среды DMEM, содержащей 600 мкг/мл *L*-глутамина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Иммуобилизованные в гранулах гидрогеля клетки культивировали при 37°C и в атмосфере 5% CO₂, используя для перемешивания магнитную мешалку. На 3-и сутки культивирования осуществляли перевод иммуобилизованных клеток на бессывороточную среду DF-SPITE, приготовленную из DMEM и NMHF (1 : 1 по объему) и содержащую 2.4 г/л бикарбоната натрия, утроенные (по отношению к рекомендуемому фирмой-изготовителем составу) количества незаменимых аминокислот, пятикратное количество витаминов, 4.5 г/л *D*-глюкозы, 5×10^{-5} М β-меркаптоэтанол, 3 мг/л аскорбиновой кислоты и 1% (по объему) добавки SPITE. Смену среды в колбах производили каждые 2–3 сут.

Выделение Fab-фрагментов моноклональных антител LNKВ-2. В работе использовали моноклональные антитела класса IgG1, полученные к рекомбинантному IL-2 человека [12]. Для наработки препаративных количеств антител гибридные клетки LNKВ-2 [4] вводили внутривенно мышам BALB/c (~10⁶ клеток на мышь), получившим за две недели до этого инъекцию 0.5 мл 2,4,10,14-тетраметилпентадекана. Через 10–20 сут у мышей с хорошо выраженной опухолью проводили отбор асцитной жидкости. Клетки осаждали центрифугированием (200g, 10 мин), а содержащую антитела асцитную жидкость осветляли центрифугированием (600g, 10 мин) и подвергали очистке по методике [17] путем осаждения загрязняющих белков каприловой кислотой с последующей сорбцией остаточных примесей на DEAE-целлюлозе DE-52.

Полученный таким образом раствор мышечных антител LNKВ-2 (10 мл, 6.3 мг/мл) диализовали в течение 12 ч против буфера, содержащего 25 мМ Трис-НСl (рН 7.3), 250 мМ NaCl, 1 мМ EDTA и 25 мМ меркаптоэтанол. Затем к полученному раствору добавляли 0.22 мл суспензии папаина с концентрацией белка 28 мг/мл и инкубировали 2.5 ч при 37°C. Папаин инактивировали добавлением иодацетамида до концентрации 30 мМ с последующей инкубацией в течение 15 мин при 37°C. Реакционную смесь диализовали против 5 мМ Трис-НСl буфера (рН 7.6) и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (1.5 × 5.5 см), уравновешенную тем же буфером. Колонку промывали сначала этим же буфером, затем вводили градиент концентрации NaCl (0–0.3 М, 100 мл). Фракции, содержащие Fab-фрагменты и элюированные в свободном объеме (рис. 1б), анализировали с помощью SDS-фореза и аналитического изо-

электрофокусирования (рис. 2). Затем Fab-фрагменты диализовали против 1% раствора глицина, концентрировали и разделяли на отдельные изоформы методом изоэлектрического фокусирования в гранулированном геле Ultrodex, в градиенте рН 7–9.5, получившимся смешением амфолинов с рН 7–9 и 8–9.5 в объемном соотношении 2 : 3. Выход выделенных фракций составил: Fab1 ~ 0.7 мг, Fab2 ~ 9.0 мг и Fab3 < 0.5 мг.

Кристаллизация Fab и его комплекса с пептидом. Кристаллы Fab-фрагментов и их комплекса с пептидом 59-72 IL-2 были получены в стандартных пластиковых плашках для культур тканей с ячейками размером 17 × 16 мм, на дно которых заливали ~1 мл противораствора, содержащего буфер, осадитель и различные добавки (таблица). В каплю противораствора объемом 5 мкл добавляли 5 мкл раствора Fab-фрагментов с концентрацией 7–14 мг/мл и помещали на силиконированное покровное стекло диаметром 22 мм (“висячая” капля) или в углубление на специальном пластиковом столике (“сидячая” капля). Покровное стекло с каплей белкового раствора затем осторожно переворачивали и наклеивали с помощью силиконовой смазки на соответствующую ячейку. Столик с каплей помещали на дно ячейки, которую также герметизировали сверху покровным стеклом. В результате диффузии через газообразное состояние при комнатной температуре концентрации высаживающих агентов в противорастворе и белковой пробе выравнивались, и при удачно выбранных составах кристаллизационных растворов образовывались кристаллы Fab-фрагментов. Время кристаллизации в зависимости от условий варьировалось в пределах 1–3 недель.

Для получения кристаллов комплекса Fab-фрагментов с пептидом использовали растворы фракции Fab2 с концентрацией ~15 мг/мл в воде и пептида в смеси вода – пропанол (1 : 2) с концентрацией 60 мг/мл. Каплю, содержащую 5 мкл белка, смешивали с 1 мкл раствора пептида и 5 мкл противораствора. Далее кристаллизацию проводили по описанной выше методике. Кристаллы комплекса образовывались через 1–1.5 месяца при комнатной температуре.

Предварительные рентгеноструктурные исследования. Пространственные группы, параметры ячеек и предельное разрешение полученных кристаллов (таблица) определяли фотометодом и дифрактометрически. Для двух кристаллических форм (№ 6 и 7, таблица) на автодифрактометре Rigaku R-AXIS II (Япония) с Image Plate детектором получены наборы экспериментальных данных в сфере разрешения 2.9 и 2.7 Å, соответственно.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта 03.0002Н-323 ГНТПР “Новейшие методы биоинженерии” (направление “Белковая инже-

нерия”) и программы РКА-НАСА “Космическая биотехнология” по проекту “Инкапсулированные гибридомы – источник ультрачистых антител”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Davies D.R., Padlan E.A., Sheriff S. // *Ann. Rev. Biochem.* 1990. V. 59. P. 439–473.
2. Alzary P.M., Lascombe M.-B., Poljak R.J. // *Ann. Rev. Immunol.* 1988. V. 6. P. 555–580.
3. Searle S.J., Pedersen J.T., Henry A.H., Webster D.M., Rees A.R. // *Antibody Engineering*. /Ed. C.A.K. Borrebaeck. New York–Oxford: Oxford University Press, 2nd Ed., 1995. P. 3.
4. Lunev V.E., Lukin Yu.V., Kazennykh N.V., Belyaev S.V., Zubov V.P., Nesmeyanov V.A. // *Biomed. Sci.* 1990. V. 1. P. 68–72.
5. Brandhuber B.J., Boone T., Kenney W.C., McKay D.B. // *Science*. 1987. V. 238. P. 1707–1709.
6. Bazan J.F. // *Science*. 1992. V. 257. P. 410–413.
7. Smith K. *Interleukin 2*. San Diego: Academic Press, 1988.
8. Оноприенко Л.В., Михалева И.И., Лунев В.Е., Несмеянов В.А., Иванов В.Т. // *Биоорганическая химия*. 1989. Т. 15. С. 908–921.
9. Балашова Т.А., Пашков В.С., Нольде Д.Е., Оноприенко Л.В., Михалева И.И., Самохвалова Л.В., Малахова Г.В., Арсеньев А.С. // *Биоорганическая химия*. 1993. Т. 19. С. 21–32.
10. Пасхин А.И., Головина Т.Н., Несмеянов В.А., Коробко В.Г. // *Биоорганическая химия*. 1995. Т. 21. С. 430–435.
11. Vikhrov A.A., Markvicheva E.A., Mareeva T.Yu., Khaidukov S.V., Nesmeyanov V.A., Manakov M.N., Goergen J.-L., Marc A., Zubov V.P. // *Biotechnol. Techniques*. 1998. V. 12. P. 11–14.
12. Балашова Т.А., Пашков В.С., Оноприенко Л.В., Михалева И.И., Мареева Т.Ю., Петрова Е.Э., Несмеянов В.А., Иванов В.Т. // *Биоорганическая химия*. 1991. Т. 17. С. 1470–1486.
13. Hudson L., Hay F.C. *Practical Immunology*. Oxford; London; Edinburgh; Boston; Melbourne: Blackwell Scientific Publications, 2nd Ed., 1980. P. 192–196.
14. Gillis S. // *J. Clin. Immunol.* 1983. V. 3. P. 1–21.
15. Parham P. // *Handbook of Experimental Immunology*/Ed. D.M. Weir. Oxford: Blackwell, 1986. V. 1. P. 14.1–14.23.
16. Boodhoo A., Mol C.D., Lee J.S., Anderson W.F. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. P. 18578–18581.
17. Sneibuch M., Audran R. // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1969. V. 134. P. 279–284.

The Preparation, Crystallization, and Preliminary X-Ray Study of a Fab-Fragment of Monoclonal Antibody to Human Interleukin-2 and Its Complex with an Antigenic Peptide

I. Yu. Mikhailova*, T. Yu. Mareeva*, I. N. Tsygannik*, I. I. Mikhaleva*, L. V. Onoprienko*, A. A. Vikhrov*, E. A. Markvicheva*, W. Pangborn**, W. Duax**, V. A. Nesmeyanov*, and V. Z. Pletnev**

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

**Hauptman–Woodward Medical Research Institute, Buffalo, NY, 14203 USA

Antigen-binding fragments (Fab) of mouse monoclonal antibodies to human interleukin-2 were obtained in preparative quantities by a modified procedure. These Fab-fragments were shown to be homogeneous according to the isoelectric focusing method. Various monocrystals of these free Fab-fragments and their complexes with the antigenic peptide corresponding to the 59–72 sequence of interleukin-2 were obtained. These were shown to be suitable for X-ray and were preliminarily studied by X-ray.

Key words: interleukin-2, monoclonal antibody, Fab-fragment, crystallization, X-ray analysis

To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 330-7510, e-mail: pletnev@amber.siobc.ras.ru.