УДК 577.27:578.81+[616.931:615.279] doi 10.15407/biotech7.01.054

ОДНОЛАНЦЮГОВІ ВАРІАБЕЛЬНІ ФРАГМЕНТИ АНТИТІЛ ПРОТИ В-СУБОДИНИЦІ ДИФТЕРІЙНОГО ТОКСИНУ, ОДЕРЖАНІ З ФАГОВОЇ БІБЛІОТЕКИ АНТИТІЛ ЛЮДИНИ

О. С. Олійник
А. А. Кабернюк
Д. В. Колибо
С. В. Комісаренко

Інститут біохімії ім. А. В. Палладіна НАН України, Київ

E-mail: lenaoliinyk@mail.ru

Отримано 19.09.2013

Дифтерійний токсин — це екзоантиген *Corynebacterium diphtheriae*, що інгібує синтез протеїну і вбиває чутливі клітини. Метою роботи було одержати рекомбінантні одноланцюгові варіабельні фрагменти антитіл людини (scFv — single-chain variable fragments) проти В-субодиниці дифтерійного токсину.

Після трьох раундів селекції фагової наївної (неімунної) бібліотеки антитіл людини проти рекомбінантної В-субодиниці дифтерійного токсину було відібрано 12 специфічних клонів. Нуклеотидні послідовності відібраних антитіл було гідролізовано ендонуклеазою *Mva*I, при цьому виявлено 6 унікальних рестрикційних патернів. Одноланцюгові антитіла експресовано у клітинах *Escherichia coli* XL1-blue і методом імуноблотингу визначено у бактеріальних екстрактах детекцією антитілами до Е-тегу. Методом імуноензимного аналізу показано здатність антитіл зв'язуватись із субодиницею В токсину, при цьому константа афінності для різних клонів становила від 10^6 до 10^8 M^{-1}.

Зважаючи на те, що одержані фрагменти антитіл специфічні до рецепторзв'язувальної В-субодиниці дифтерійного токсину, доцільним є подальше дослідження їхніх токсиннейтралізуючих властивостей та терапевтичного потенціалу. Окрім того, одержані scFv-антитіла можуть бути використані для детекції та дослідження біологічних властивостей дифтерійного токсину.

Ключові слова: scFv-антитіла, дифтерійний токсин, фаговий дисплей, наївна бібліотека рекомбінантних антитіл людини.

Основні патологічні прояви дифтерії зумовлені дією дифтерійного токсину. Його виявлення є ключовим у діагностиці цієї хвороби, а протидифтерійна терапія спрямована як на знищення самого збудника, так і на нейтралізацію цитотоксичної активності токсину [1].

Дифтерійний токсин є представником групи А–В-токсинів, яким притаманне розділення рецепторз'язувальної та каталітичної функції між різними ділянками — А- та В-фрагментами, які також називають субодиницями. Безпосередньою мішенню для А-фрагмента є фактор елонгації EF-2 [2]. Токсин каталізує реакцію рибозилювання EF-2, що призводить до його інактивації та, як наслідок, до зупинки синтезу протеїну. Субодиниця В відповідає за зв'язування із рецептором клітин-мішеней і проникнення субодиниці А в цитозоль [3].

Відомо, що моноклональні антитіла, які здатні нейтралізувати дифтерійний токсин, у більшості випадків специфічні саме до його В субодиниці [4, 5]. Субодиниця В містить сайт зв'язування із клітинним рецептором, і коли ця ділянка блокується антитілами, токсин втрачає токсичність та здатність проникати всередину клітин-мішеней [4].

Під час лікування дифтерії важливо не лише знищити збудника, а й нейтралізувати дифтерійний токсин. Як джерело антитоксинів застосовують здебільшого антисироватку, одержану від гіперімунізованих коней, що здатна ефективно нейтралізувати цитотоксичну активність дифтерійного токсину. Однак сироватка коня, навіть після очищення, може спричинювати у пацієнтів низку патологічних реакцій, зокрема сироваткову хворобу і навіть анафілаксичний шок [5, 6]. Одержано низку токсиннейтралізуючих

моноклональних антитіл миші [4, 7]. Проте для їх використання в ролі антитоксинів потрібно видалити ксеногенні мишачі Fc-фрагменти антитіл.

Застосування сучасних генних технологій дає змогу отримувати рекомбінантні антитіла, позбавлені Fc-фрагментів. Так, рекомбінантні одноланцюгові варіабельні фрагменти антитіл — scFv (single chain fragment variable), які відповідають активному центру антитіла, здатні специфічно зв'язуватись із цільовим антигеном, але є значно менш імуногенними, оскільки не мають константних доменів. Раніше із фагової бібліотеки scFv-антитіл миші нами було одержано низку scFv, яким притаманна здатність інгібувати зв'язування токсину з клітинами-мішенями [8]. Однак навіть такі рекомбінантні фрагменти антитіл є чужорідними для людини протеїнами, оскільки кодуються генами миші. Метою роботи було одержати scFv-антитіла до B-субодиниці дифтерійного токсину із фагової бібліотеки, сконструйованої на основі наївного (неімунного) репертуару імуноглобулінів людини. З огляду на те, що такі рекомбінантні антитіла за природою є повними аналогами антитіл людини, ризик розвитку побічних імунологічних реакцій проти них суттєво нижчий, ніж проти імуноглобулінів тварин.

Матеріали і методи

Бібліотека scFv-антитіл людини. Селекцію проводили з бібліотеки scFv-антитіл людини, представленою 10^9 різними специфічностями. Для конструювання бібліотеки було використано модифікований фагмідний вектор p*CANTAB*-5E (рис. 1) та клітини *Escherichia coli* XL1-blue (генотип : *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F′ *proAB lacI*q*ZΔM15* Tn*10* (Tetr)]).

Селекцію scFv-антитіл виконували, як описано раніше [9]. Загалом для відбору позитивних клонів було проведено три раунди селекції методом фагового дисплея у мікротитрувальних планшетах. Як антиген використовували рекомбінантний аналог B-субодиниці дифтерійного токсину (sbB), імуногенні властивості якого ідентичні його природній B-субодиниці [9, 10].

Аналіз поліморфізму рестриктних фрагментів. ДНК-послідовності scFv-антитіл ампліфікували з фагмідної ДНК за допомогою секвенувальних праймерів pCANTAB-S1 та pCANTAB-S6. Одержані ДНК-послідовності обробляли ендонуклеазою рестрикції *Mva*I (сайт рестрикції 5´-C CˆA G G-3´). Рестриктні фрагменти розділяли у 12%-му поліакриламідному гелі.

Екстракція периплазматичної фракції. Виділення периплазматичних екстрактів проводили, піддаючи клітини осмотичному шоку, згідно з описаною раніше методикою [9]. Концентрацію scFv-антитіл у периплазматичних екстрактах визначали методом денситометрії, аналізуючи електрофореграми за допомогою програми TotalLab TL120.

Імуноензимний аналіз. Усі розчини послідовно інкубували в лунках планшета протягом 60 хв за 37 °C. Антиген наносили в концентрації 10 мкг/мл у забуференому фізіологічному розчині (ЗФР) (0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,144% Na_2HPO_4, 0,024% KH_2PO_4, pH 7,4) в об'ємі 100 мкл на одну лунку. Потім лунки тричі промивали ЗФР і вносили по 150 мкл 5%-го розчину знежиреного молока у ЗФР. Після відмивання додавали периплазматичні екстракти у буфері ТФБ (ЗФР з 0,04% твін-20), лунки знову промивали і вносили антитіла проти злитої із scFv маркерної послідовності (E-тегу), у буфері ТФБ (розведення 1:6000). Після інкубації лунки промивали і додавали кон'юговані з пероксидазою хрону антитіла проти мишачих імуноглобулінів у розведенні 1:5 000 у буфері ТФБ. Для проявлення використовували розчин, що містив 5 мг ортофенілендіаміну (Sigma, США), 12,5 мл 0,2 M Na-цитратного буфера (pH 5,0) та 5 мкл пероксиду водню. Через 20 хв реакцію зупиняли додаванням 2M H_2SO_4 по 50 мкл на лунку. Результати аналізу одержували вимірюванням за довжини хвилі 490 нм.

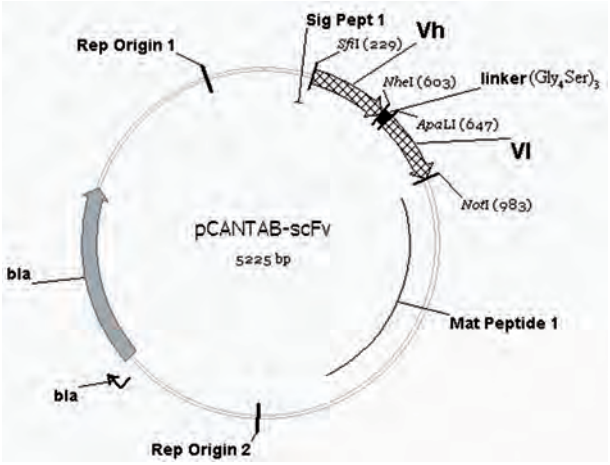

Рис. 1. **Схема фагміди pCANTAB-5E з ДНК-послідовністю scFv-антитіла.** Розмір послідовності scFv може дещо варіювати для різних клонів

Імуноблотинг. Після електрофорезу протеїни переносили на нітроцелюлозну мембрану електропереносом 75 хв за сили струму 38 мА. Після цього нітроцелюлозну мембрану інкубували 60 хв при 37 °С у блокувальному розчині (5% -не знежирене молоко у ЗФР). Потім мембрану промивали й інкубували з антитілами проти Е-тегу 60 хв за 37 °С. Далі мембрану знову промивали і 60 хв за тієї самої температури інкубували з антитілами проти мишачих імуноглобулінів, кон'югованих з пероксидазою хрону. Після інкубації мембрану промивали і переносили для проявлення у розчин, що містив 0,06% діамінобензидину (Sigma, США) та 0,001% пероксиду водню у ЗФР.

Визначення константи афінності проводили згідно з раніше описаною методикою [11]. Загалом цей параметр визначали за формулою:

$$A0/Ax = 1 + Ka \cdot a0,$$

де Ka — константа афінності; A0 — значення оптичної густини у лунці без конкурентного антигену; Ax — значення оптичної густини в лунці з даною концентрацією конкурентного антигену; a0 — концентрація конкуруючого антигену.

Результати та обговорення

Відбір scFv-антитіл, специфічних до B-субодиниці дифтерійного токсину. Було проведено три раунди селекції бібліотеки проти рекомбінантної B-субодиниці дифтерійного токсину. Для першого раунду селекції брали 10^{14} фагових частинок і одержали після селекції близько 10^4 клонів. У другий і третій раунди брали по 10^{11} фагових частинок. Після другого раунду було відібрано близько 10^6 клонів, а після третього — близько 10^8. Після попереднього скринінгу клонів, відібраних після третього раунду селекції, для подальшого тестування методом імуноензимного аналізу обрали 15 клонів. Усі досліджені scFv реагували із субодиницею B дифтерійного токсину, проте антитіла трьох клонів також реагували з контрольним антигеном (сироватковим альбуміном бика) і в подальшому їх не досліджували (рис. 2).

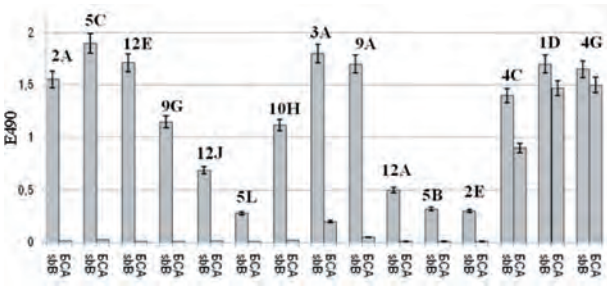

Рис. 2. **Імуноензимний аналіз периплазматичних екстрактів клонів-продуцентів scFv-антитіл:**
sbB — рекомбінантна B-субодиниця;
БСА — сироватковий альбумін бика

Аналіз поліморфізму рестриктних фрагментів ДНК-послідовностей scFv-антитіл. Після гідролізу ДНК-послідовностей відібраних 12 клонів ендонуклеазою рестрикції *Mva*I було визначено, що три клони — 5B, 12A та 5C — характеризуються унікальним профілем рестриктних фрагментів, а інші клони за цим параметром можна розділити на окремі групи: 1 — клони 2E, 10H, 12E, 9G, 5L; 2 — клони 2A та 12J; 3 — клони 9A та 3A (рис. 3). Відмінності у профілях рестриктних фрагментів вказують на відмінності у послідовностях ДНК відповідно, серед 12 досліджених клонів принаймні 6 мають різні нуклеотидні послідовності.

Аналіз синтезу scFv-антитіл клонами-продуцентами. Штам *E. coli* XL1-blue є супресійним (*supE*+), тому амбер-стоп-кодон, розташований у фагміді pCANTAB 5E між ДНК-послідовністю scFv-антитіла та фагового гена 3, приблизно у 20% випадків не розпізнається, що призводить до синтезу злитих протеїнів scFv-g3p. Такі злиті протеїни виявляються під час селекції на поверхні фагових частинок. Отже, очікували, що одержані клони-продуценти будуть здатні синтезувати як вільну, так і злиту з g3p форму scFv.

Наявність scFv-антитіл у лізаті клітин-продуцентів визначали методом імуно-

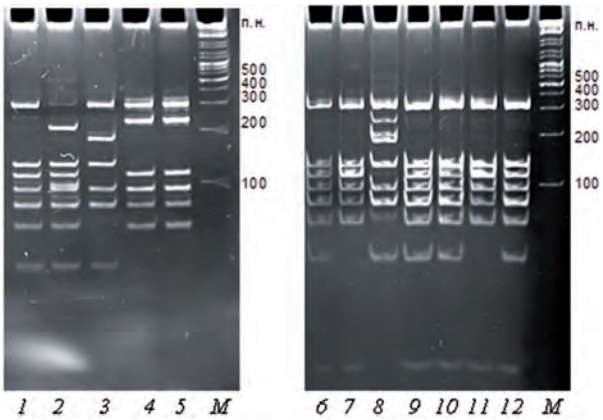

Рис. 3. **Рестриктний аналіз ДНК-послідовностей scFv-антитіл ендонуклеазою рестрикції *MvaI*:**
1 — клон 2E; *2* — клон 5B; *3* — клон 12A; *4* — клон 9A; *5* — клон 3A; *6* — клон 10H; *7* — клон 2A; *8* — клон 5C; *9* — клон 12E; *10* — клон 9G; *11* — клон 12J; *12* — клон 5L; *M* — маркери

блотингу. Аналізували периплазматичний екстракт і фракцію, що залишається після його виділення (відповідає переважно цитозольній фракції). Як видно з рис. 4, для всіх клонів характерною була смуга з молекулярною масою близько 33 кДа, що відповідала очікуваним розмірам вільних scFv-антитіл, та смуга з вищою молекулярною масою, що, можливо, відповідала scFv-антитілам, злитим із фаговим протеїном g3p (~100 кДа), і продуктам деградації цього злитого протеїну.

Аналіз екстрактів свідчив про те, що значна частина цільового протеїну під час одержання периплазматичних екстрактів залишалась у цитозольній фракції. Разом з тим у периплазматичному екстракті детектували переважно вільні scFv-антитіла. Натомість для всіх клонів цитозольна фракція була місцем переважної локалізації scFv-антитіл, злитих із фаговим протеїном g3p.

Специфічність відібраних scFv-антитіл. Досліджуючи специфічність scFv-антитіл, як антиген використовували одержаний нами раніше рекомбінантний аналог B субодиниці дифтерійного токсину, який зберігає його антигенні властивості [10]. Сироватковий альбумін бика застосовували як контрольний антиген. За результатами імуноензимного аналізу всі одержані антитіла не реагували з контрольним антигеном. Достовірний сигнал взаємодії з цільовим антигеном реєстрували за концентрації scFv-антитіл нижче 1 мкг/мл. На рис. 5 наведено результати імуноензимного аналізу для scFv-антитіл клонів 12J та 5B.

Афінність відібраних scFv-антитіл. Важливою характеристикою антитіл є афінність їх до цільового антигену. З імунних бібліотек, створених на основі генетичного матеріалу імунізованих донорів, відібрати високоафінні антитіла значно простіше, ніж у разі відбору з наївних бібліотек. Проте, коли в наївній бібліотеці представлено достатньо велику кількість різних специфічностей (у нашому випадку 10^9), під час селекції клонів можна створити умови для їх високої конкуренції за зв'язування з антигеном і одержати високоспецифічні й афінні рекомбінантні антитіла. Після кожного нового раунду селекції кількість відібраних клонів зростала приблизно в 100 разів, що свідчило про відбір та збільшення питомої частки специфічних клонів.

Для визначення константи афінності проводили конкурентний імуноензимний аналіз, в якому за сталої концентрації scFv-антитіл змінювали концентрацію конкурентного антигену.

Константи афінності для одержаних клонів мали значення від 10^6 M^{-1} до 10^8 M^{-1} (таблиця).

На сьогодні описано низку антитоксичних одноланцюгових рекомбінантних антитіл, наприклад, проти отрути скорпіона [12], африканської бджоли [13], клостридіального токсину [14] тощо. Більше того, у наших попередніх дослідженнях вже було одержано одноланцюгові рекомбінантні антитіла миші,

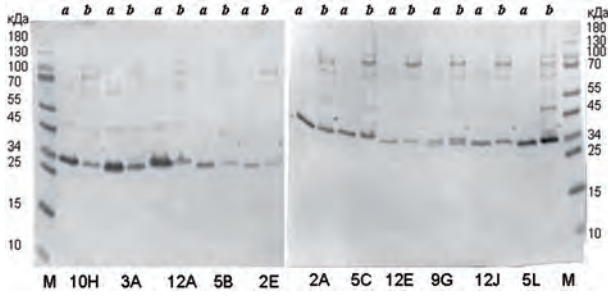

Рис. 4. **Імуноблотинг клітинних екстрактів одержаних клонів-продуцентів:**
a — периплазматичний екстракт;
b — цитоплазматичний екстракт
(назви клонів наведено внизу)

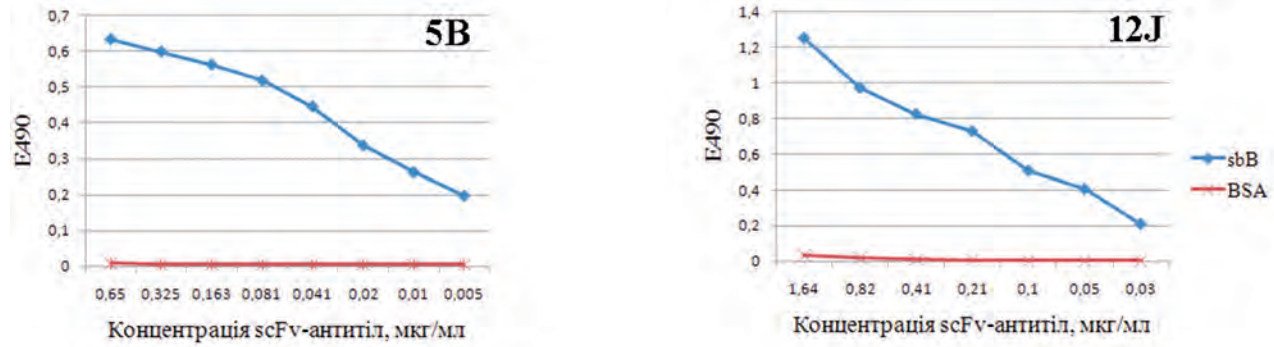

Рис. 5. **Імуноензимний аналіз периплазматичного екстракту клонів 5B та 12J:**
sbB — рекомбінантна субодиниця B дифтерійного токсину;
BSA — сироватковий альбумін бика
(результати відображають один із серії типових експериментів)

Значення констант афінності та дисоціації одержаних scFv-антитіл, специфічних до B-субодиниці дифтерійного токсину

Назва клону scFv-антитіл	Константа афінності, Ка	Константа дисоціації, Kd
5B	$1{,}45 \cdot 10^{8}$ M^{-1}	$6{,}8 \cdot 10^{-9}$ M
5C	$1 \cdot 10^{8}$ M^{-1}	$1 \cdot 10^{-8}$ M
12J	$4{,}2 \cdot 10^{7}$ M^{-1}	$2{,}3 \cdot 10^{-8}$ M
2A	$3{,}9 \cdot 10^{7}$ M^{-1}	$2{,}5 \cdot 10^{-8}$ M
9A	$4{,}1 \cdot 10^{7}$ M^{-1}	$2{,}4 \cdot 10^{-8}$ M
9G	$2{,}4 \cdot 10^{7}$ M^{-1}	$4{,}2 \cdot 10^{-8}$ M
3A	$2{,}09 \cdot 10^{7}$ M^{-1}	$4{,}8 \cdot 10^{-8}$ M
12E	$1{,}4 \cdot 10^{7}$ M^{-1}	$7{,}1 \cdot 10^{-8}$ M
5L	$1{,}1 \cdot 10^{7}$ M^{-1}	$9 \cdot 10^{-8}$ M
10H	$1{,}02 \cdot 10^{7}$ M^{-1}	$9{,}8 \cdot 10^{-8}$ M
12A	10^{7} M^{-1}	10^{-7} M
2E	$4{,}07 \cdot 10^{6}$ M^{-1}	$2{,}4 \cdot 10^{-7}$ M

що ефективно блокували зв'язування токсину з клітинами-мішенями. Афінність таких токсиннейтралізуючих одноланцюгових антитіл становила від 10^{7} M^{-1} до 10^{8} M^{-1} [8].

Таким чином, можна передбачити наявність токсиннейтралізуючих властивостей у одержаних в цій роботі одноланцюгових антитіл проти B-субодиниці дифтерійного токсину, що потребує проведення подальших досліджень. Окрім того, ці антитіла можуть бути використані для детекції та дослідження біологічних властивостей дифтерійного токсину.

REFERENCES

1. *Atkinson W., Wolfe S., Hamborsky J.* Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. 12th ed., second printing. *Washington DC: Public Health Foundation*. 2012, 324 p.
2. *Honjo T., Nishizuka Y., Hayaishi O.* Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. *J. Biol. Chem*. 1968. 243(12), 3553–3555.
3. *Rolf J. M. Gaudin H. M., Eidels L.* Localization of the diphtheria toxin receptor-binding domain to the carboxyl-terminal Mr approximately 6000 region of the toxin. *J. Biol. Chem*. 1990, 265(13), 7331–7337.
4. *Zucker D. R., Murphy J. R.* Monoclonal antibody analysis of diphtheria toxin-I. Localization of epitopes and neutralization of cytotoxicity. *Mol. Immunol*. 1984, 21(9), 785–793.
5. *Valiakina T. I., Lakhtina O. E., Komaleva R. L., Simonova M. A., Samokhvalova L. V., Shoshina N. S., Kalinina N. A., Rubina A. Iu., Filippova M. A., Vertiev Iu. V., Grishin E. V.* Production and Characteristics of Monoclonal Antibodies to the Diphtheria Toxin. *Bioorg Khim*. 2009, 35(5), 618–28. (In Russian).
6. *Naiditch M. J., Bower A. G.* Diphtheria; a study of 1,433 cases observed during a ten-year period at the Los Angeles County Hospital. *Amer. J. Med*. 1954, 17(2), 229–245.
7. *Zaitse V. E. M., Sviridov V. V., Titova N. G., Lebedev V. S., Garipova M. I.* Antitoxic properties of monoclonal antibodies against diphtheria toxin. *Mol. Gen. Microbiol. Virusol*. 1985, N 2, 37–41.
8. *Oliinyk O. S., Labyntsev A. J., Korotkevych N. V., Kolibo D. V., Komisarenko S. V.* Study on toxin-neutralization properties of recombinant singlechain variable antibody's fragments against diphtheria toxin B subunit. *Biopolymers and Cell*. 2009, 24(4), 315–318. (In Ukrainian).
9. *Oliinyk O. S., Kaberniuk A. A., Redchuk T. A., Kolibo D. V., Komisarenko S. V.* Construction of bifunctional molecules specific to antigen and antibody's Fc-fragment by fusion of scFv-antibodies with staphylococcal protein A. *Biopolymers and Cell*. 2009, 25(3), 245–249. (In Ukrainian).
10. *Kaberniuk A. A., Oliinyk O. S., Redchuk T. A., Romaniuk S. I., Kolibo D. V., Komisarenko S. V.* Cloning and expression of diphtheria toxin's recombinant subunits of Corynebacterium diphtheriae in *Escherichia coli*. *Dop. NAN Ukrainy*. 2008, V. 3, 160–166. (In Ukrainian).
11. *Bobrovnik S. A. Komisarenko S. V., Ilyina L. V.* Novel and simple ELISA-based method for antibody affinity determination. *Ukr. Biokhim. Zh*. 2005, 77(2), 169–74. (In Ukrainian).
12. *Pucca M. B., Zoccal K. F., Roncolato E. C., Bertolini T.B., Campos L. B., Cologna C. T., Faccioli L. H., Arantes E. C., Barbosa J. E.* Serrumab: a human monoclonal antibody that counters the biochemical and immunological effects of Tityus serrulatus venom. *J. Immunotoxicol*. 2012, 9(2), 173–183.

13. *Funayama J. C., Pucca M. B., Roncolato E. C., Bertolini T. B., Campos L. B., Cologna C. T., Facciolli L. H., Arantes E. C., Barbosa J. E.* Production of human antibody fragments binding to melittin and phospholipase A2 in Africanised bee venom: minimising venom toxicity. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol*. 2012, 110(3), 290–297.

14. *Arya P., Ponmariappan S., Singh L., Prasad G. B.* Antibodies against recombinant catalytic domain of lethal toxin of Clostridium sordellii neutralize lethal toxin toxicity in HeLa cells. *Prot. Pept. Lett*. 2013, 20(2), 205–212.

ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫЕ ВАРИАБЕЛЬНЫЕ ФРАГМЕНТЫ АНТИТЕЛ ПРОТИВ В-СУБЪЕДИНИЦЫ ДИФТЕРИЙНОГО ТОКСИНА, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ ФАГОВОЙ БИБЛИОТЕКИ АНТИТЕЛ ЧЕЛОВЕКА

Е. С. Олейник
А. А. Кабернюк
Д. В. Колибо
С. В. Комисаренко

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев

E-mail: lenaoliinyk@mail.ru

Дифтерийный токсин — это экзоантиген *Corynebacterium diphtheriae*, ингибирующий синтез протеина и убивающий чувствительные клетки. Целью работы было получение одноцепочечных вариабельных фрагментов антител человека (scFv — single-chain variable fragments) против рецепторсвязывающей В-субъединицы дифтерийного токсина.

После трех раундов селекции фаговой наивной (неиммунной) библиотеки против рекомбинантной В-субъединицы были отобраны 12 специфичных клонов. Нуклеотидные последовательности отобранных антител были гидролизированы эндонуклеазой *Mva*I, при этом выявлено 6 уникальных рестриктных паттернов. Одноцепочечные антитела были экспрессированы в клетках *Escherichia coli* XL1-blue и методом иммуноблотинга определены в бактериальных экстрактах детекцией антителами к Е-тегу. Методом иммуноэнзимного анализа продемонстрирована способность антител связываться с В-субъединицей токсина, при этом константа аффинности для разных клонов составляла от 10^6 до 10^8 M^{-1}.

Поскольку полученные фрагменты антител специфичны к рецепторсвязывающей В-субъединице дифтерийного токсина, целесообразно дальнейшее исследование их токсиннейтрализующих свойств и терапевтического потенциала. Кроме того, полученные scFv-антитела могут быть использованы для детекции и исследования биологических свойств дифтерийного токсина.

Ключевые слова: scFv-антитела, дифтерийный токсин, фаговый дисплей, наивная библиотека рекомбинантных антител человека.

SINGLE CHAIN VARIABLE FRAGMENTS OF ANTIBODIES AGAINST DIPHTHERIA TOXIN B-SUBUNIT ISOLATED FROM PHAGE DISPLAY HUMAN ANTIBODY LIBRARY

O. S. Oliinyk
A. A. Kaberniuk
D. V. Kolibo
S. V. Komisarenko

Palladin Institute of Biochemistry of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

E-mail: lenaoliinyk@mail.ru

Diphtheria toxin is an exoantigen of *Corynebacterium diphtheriae* that inhibits protein synthesis and kills sensitive cells. The aim of this study was to obtain human recombinant single-chain variable fragment (scFv) antibodies against receptor-binding B subunit of diphtheria toxin.

12 specific clones were selected after three rounds of a phage display naïve (unimmunized) human antibody library against recombinant B-subunit naive. scFv DNA inserts from these 12 clones were digested with *Mva*I, and 6 unique restriction patterns were found. Single-chain antibodies were expressed in *Escherichia coli* XL1-blue. The recombinant proteins were characterized by immunoblotting of bacterial extracts and detection with an anti-E-tag antibody. The toxin B-subunit-binding function of the single-chain antibody was shown by ELISA. The affinity constants for different clones were found to be from 10^6 to 10^8 M^{-1}.

Due to the fact, that these antibody fragments recognized epitopes in the receptor-binding B-subunit of diphtheria toxin, further studies are interesting to evaluate their toxin neutralization properties and potential for therapeutic applications. Obtained scFv-antibodies can also be used for detection and investigation of biological properties of diphtheria toxin.

Key words: scFv-antibodies, diphtheria toxin, phage display, naïve human recombinant antibody library.