

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.21:322

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ

ВВЕДЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ФРАГМЕНТОВ ИНТЕРФЕРОНА- α_2 И ИНСУЛИНА В СОСТАВ ИСКУССТВЕННОГО БЕЛКА АЛЬБЕБЕТИНА ВЛИЯЕТ НА ИММУНОГЕННОСТЬ ИТОГОВОЙ КОНСТРУКЦИИ

**О. В. Бочарова¹, С. А. Мошковский², Р. В. Черткова¹,
З. Х. Абдуллаев¹, Е. Ф. Колесанова², Д. А. Долгих¹,
М. П. Куртичников¹**

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая 16/10, ГСП-7, В-437; факс: 335-5033, электронная почта: obon@nmr.ru

²Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119992, Москва, ул. Погодинская 10; факс: 245-0857

Представлены данные об иммуногенности искусственного белка альбобетина и его производных, несущих активные фрагменты, при иммунизации ими кур, а также вкладе каждого компонента белковой конструкции в иммуногенность целой молекулы. Два из трех исследуемых белков имеют в своем составе пептидные фрагменты человеческих интерферона- α_2 и инсулина. Выявлены три непрерывные антигенные детерминанты, имеющие разный иммуногенный потенциал. Показано, что фрагмент интерферона является иммунодоминантным в молекулах альбобетина и альбобетин-инсулина. Фрагмент инсулина не является иммуногенным. Все непрерывные В-эпитопы расположены на границах элементов вторичной структуры и на предполагаемой поверхности молекулы альбобетина. Предполагается, что активные фрагменты, введенные в состав искусственного белка-носителя могут влиять на иммунологические свойства конструкции.

Ключевые слова: искусственные белки, картирование В-эпитопов, иммуногенность

ВВЕДЕНИЕ. Дизайн искусственных белков (белков *de novo*) с заданной структурой и функцией является одной из интереснейших отраслей современной белковой инженерии. В 1988 году Regan и De Grado сообщили о первом успешном конструировании белка *de novo*, полученного в *E. coli* из искусственного гена [1]. С тех пор было сконструировано

несколько десятков искусственных белков, большинство из которых повторяют трехмерную структуру природных белков [2, 3]. Альбегетин (ABV) - первый белок, сконструированный таким образом, что имеет заданную третичную структуру и уникальную топологию, не встречающуюся в природных белках. Он был получен в 1991 году (ID белка CAA47376) [4-6]. Следующим шагом было создание белка, обладающего не только заданной третичной структурой, но и биологической активностью. Альбегетин был предложен в качестве "носителя" для такой биологической активности. Первым фрагментом, избранным для введения в белок *de novo* активности, стал октапептидный фрагмент LKEKKYSP человеческого интерферона- α [6]. Полученная конструкция - альбегетин (ABVI, ID AAG59605), как и сам октапептид, обладает требуемой активностью, а именно активирует бласттрансформацию мышечных тимоцитов *in vitro* [7]. Недавно на основе альбегетина был сконструирован еще один белок *de novo*, несущий нанопептидный фрагмент человеческого инсулина GERGFFYCN (ABVI-Ins, ID AAG59605). Этот нанопептидный фрагмент обладает инсулиноподобной активностью, стимулируя поглощение меченой ^{14}C глюкозы в культуре клеток линии L 929 [8]; активность химерного белка в настоящее время изучается. Аминокислотные последовательности альбегетина и белка с двумя фрагментами показаны на рис. 1.

ABV	MDPGDPECLEQLLRRLLGGSVEVEVTGGTVHVEVSPEDP
ABVI	MLKEKKYSP DPGDPECLEQLLRRLLGGSVEVEVTGGTVHVEVSPEDP
ABVI-Ins	MLKEKKYSP DPGDPECLEQLLRRLLGGSVEVEVTGGTVHVEVSPEDP

GDPECLEQLLRRLLGGSVEVEVTGGTVHVEVSPEDR
 GDPECLEQLLRRLLGGSVEVEVTGGTVHVEVSPEDR
 GDPECLEQLLRRLLGGSVEVEVTGGTVHVEVSP**GERGFFYCN**

Рисунок 1.

Аминокислотные последовательности альбегетина, альбегетина и альбегетина с фрагментом инсулина. Фрагменты интерферона (2-9) и инсулина (79-86) выделены жирным курсивом.

Хотя искусственные белки изучаются более 10 лет, об их иммунологических свойствах до сих пор известно мало. Существует два противоположных мнения по поводу иммуногенности искусственных белков. С одной стороны, можно предположить, что простые аминокислотные последовательности, предназначенные только для достижения требуемой структуры, и не имеющие подобия или гомологии с белками животных и растений, не будут "представлять интереса" для иммунной системы и будут неиммуногенными. Вторая противоположная точка зрения предполагает, что белки *de novo* будут обладать выраженной иммуногенностью из-за огромного "филогенетического" расстояния между ними и любым из организмов. "Правильность" этих мнений можно проверить только экспериментально, так как теоретический анализ возможной антигенности, основанный на поиске Т- и В-эпитопов, встречающихся в последовательностях природных белков, в данном случае малоэффективен, поскольку последовательности искусственных белков отличаются от природных по определению. Изучения иммунологических свойств искусственных белков представляет не только фундаментальный, но и практический интерес, поскольку в будущем возможно применение

обладающих активностью белковых конструкций с активными сайтами из других биомакромолекул в качестве фармакологических препаратов. При этом молекула носителя и сам препарат не должны быть иммуногенными и иметь перекрестную реактивность с собственными белками организма.

Недавно разработан метод синтеза и анализа пептидов "на иглах", который позволяет выявить все непрерывные антигенные детерминанты белка. Контактные В-эпитопы белков обычно состоят из 3-6 аминокислотных остатков (а.о.), и поэтому использование набора перекрывающихся гексапептидов с шагом в один а.о., полностью охватывающих последовательность белка, достаточно для определения всех непрерывных В-эпитопов этого белка.

Предыдущее исследование иммуногенности альбумина на мышях показало, что он проявляет умеренную иммуногенность [9]. Представляет интерес выяснить, насколько отличается сила и специфичность иммунного ответа при иммунизации искусственными белками животных филогенетически далекого от млекопитающих вида, а именно - птиц. В настоящей работе представлены данные об иммуногенности альбумина и его производных, несущих активные фрагменты, при иммунизации ими кур, а также о вкладе каждого компонента белковой конструкции в иммуногенность целой молекулы.

МЕТОДИКА. *Конструирование генов и векторов, экспрессия генов, выделение и очистка белков.* Процедуры конструирования и экспрессии генов, выделения и очистки белков проводили, как описано ранее [9]. Выход очищенных альбумина и альбумина с фрагментом инсулина составлял 12-15 мг/л клеточной культуры; альбумина и альбумина с фрагментом инсулина - 8-10 мг.

Иммунизация животных. Кур иммунизировали очищенными белками по 200 мкг на каждое животное. Для первой иммунизации лиофильно высушенный белок растворяли в фосфатно-солевом буфере, смешивали с равным объемом полного адьюванта Фрейнда ("DIFCO Laboratories", США), смесь тщательно диспергировали и вводили животным по 1 мл внутримышечно вокруг шеи. На 28 день после первой инъекции для повторной иммунизации животным вводили те же дозы, но без адьюванта. На 7 день после последней иммунизации снесенные яйца отбирали и выделяли из них желтков иммуноглобулины, как описано ранее [10]. Концентрация общего IgY в препарате составляла 7-11 мг/мл, чистота препарата около 95% согласно данным электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия [11]. Контрольные (преимунные) препараты иммуноглобулинов выделяли из желтков яиц, полученных до иммунизации.

Твердофазный иммуноферментный анализ с белками, сорбированными на пластик. Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) препаратов антител проводили, как описано в работе [9]. Титром антител считали первое разведение, значение оптической плотности которого превышало фоновое значение не менее, чем в 2 раза. В конкурентных экспериментах раствор препарата антител и конкурирующего агента преинкубировали при 37°C в течение 1 часа.

Твердофазный синтез гексапептидов на полипропиленовых иглах. Синтезировали 82 перекрывающихся гексапептида с шагом в один аминокислотный остаток, полностью охватывающих последовательность конструкции с двумя фрагментами. Синтез с использованием Fmoc- α -L-аминокислот в присутствии 1-гидроксибензотриазола и диизопропилкарбодиимида был выполнен согласно инструкции производителя ("Mimotopes", Австралия), как описано ранее [12, 13].

ИФА, связанных с иглами пептидов. ИФА с использованием препаратов антител против различных белковых конструкций проводили по ранее описанной методике [13]. В качестве вторичных антител использовали меченные пероксидазой хрена антитела козы к куриным IgY. Сразу после окончания синтеза и после каждого цикла ИФА пептиды отмывали обработкой ультразвуком в 0,1М Na-фосфатном буфере, pH 7,2, содержащем 1% (м./об.) додецилсульфата натрия и 0,1% (м./об.) 2-меркаптоэтанола при температуре 60°C, далее - дважды водой той же температуры и, затем, кипящим метанолом.

Величину A_{405} , соответствующую линии отсечения значимых величин от фоновых, определяли следующим образом: для половины минимальных значений оптической плотности рассчитывали среднее значение (M) и величину стандартного отклонения (s). За высоту линии отсечения принимали значение, равное $M+s$. Расчет проводили для каждого эксперимента в отдельности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Для получения куриных антител против искусственных белков аутобредных кур иммунизировали белковыми конструкциями: альбелбетин (ABV, 7,8 кДа), альбеферон (ABVI, 8,8 кДа) и химерный белок тиоредоксин+альбеферон с фрагментом инсулина (TRX-ABVI-Ins, 16,9+9,4 кДа), который представляет собой промежуточный продукт системы экспрессии, но является вполне подходящим для иммунизации. Из яиц, полученных до и после иммунизации, выделяли фракцию иммуноглобулинов.

Чувствительность препаратов IgY при детекции соответствующих белков определяли методом ИФА и составляла 0,625, 0,625, и 5 мкг/мл для TRX-ABVI-Ins, ABVI и ABV соответственно. От иммунных животных одновременно с забором яиц были получены сыворотки и определены титры антител в них. Титры сывороточных IgY против TRX-ABVI-Ins, ABVI и ABV составляли 1:16000, 1:8000 и 1:2000 соответственно. Таким образом, эффективность продукции желточных и сывороточных антител приблизительно одинакова, если учесть, что концентрация сывороточных антител составляет около 10 мг/мл. Это также объясняется фактом происхождения желточных антител из сывороточных. Очевидно, что присутствие фрагмента интерферона приводит к образованию у животных антител с большей авидностью к ABVI и TRX-ABVI-Ins по сравнению с антителами к ABV.

На рис. 2 показан результат эксперимента по выявлению перекрестной реактивности различных конструкций с препаратом IgY против альбелбетина. Из рисунка видно, что ABVI и ABV проявляют практически полную перекрестную реактивность и это означает, что все B-эпитопы, экспонированные на ABV, доступны также и на молекуле ABVI. С другой стороны, антигенная структура TRX-ABVI-Ins значительно отличается от таковых ABVI и ABV. Хотя TRX-ABVI-Ins обладает довольно сильной иммуногенностью, низкая перекрестная реактивность может являться результатом экспонирования антигенных сайтов на его поверхности, которые отсутствуют у ABVI и ABV, тогда как их общие антигенные сайты супрессированы.

Контрольные преиммунные и экспериментальные иммунные препараты антител тестировали в ИФА с 82 синтезированными гексапептидами, полностью перекрывающими последовательность белка с фрагментом интерферона- $\alpha 2$ на N-конце и инсулина на C-конце с шагом в

один аминокислотный остаток. Порядковым номером гексапептида является его положение в последовательности АВВІ-Ins. Все препараты тестировали на связывание с гексапептидами в двух концентрациях. Результаты связывания гексапептидов с куриными антителами суммированы в таблице, где показаны антигенные гексапептиды и антигенные сайты, сформированные ими. Следует заметить, что в молекуле альбестина непрерывные антигенные сайты не были обнаружены.

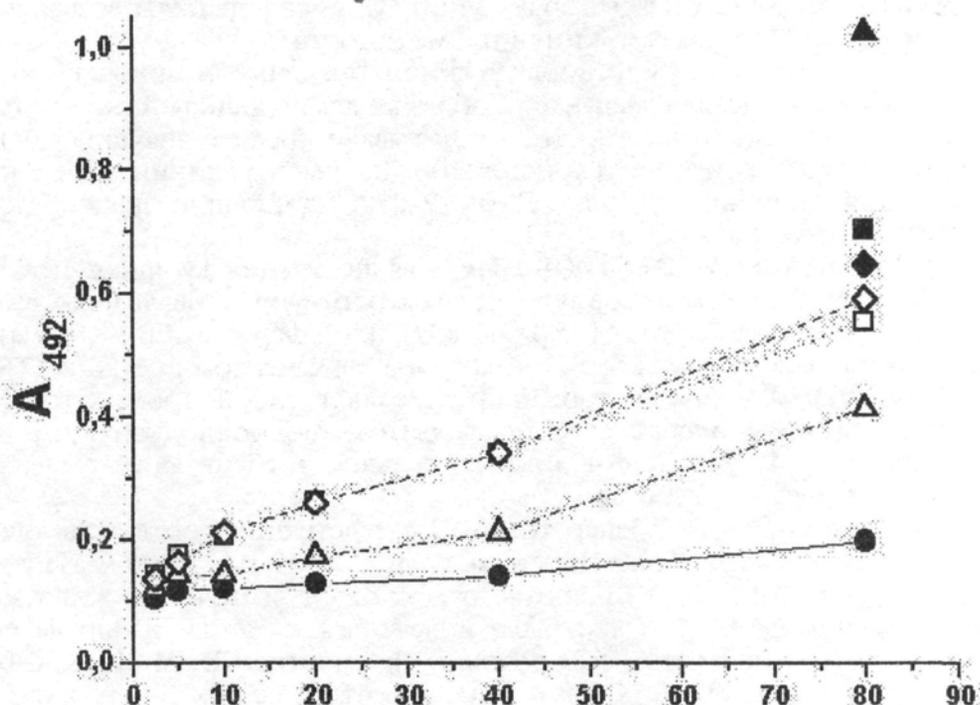


Рисунок 2.

Перекрестное взаимодействие антител против АВВ с АВВ (◇), АВВІ (□) и АВВІ-Ins (Δ). Связывание препарата IgY против АВВІ (■) и TRX-АВВІ-Ins (▲) с нативными антигенами использовался как положительный контроль. Связывание анти-TRX-АВВІ-Ins препарата с АВВ использовался как положительный контроль взаимодействия антител с АВВ (◆). Связывание АВВІ-Ins с преиммунным препаратом IgY является отрицательным контролем (●).

Увеличение концентрации антител с 25 до 80 мкг/мл не выявило дополнительных антигенных детерминант, поэтому концентрацию 25 мкг/мл использовали в дальнейшем для экспериментов по конкурентному ингибированию. Выявленные антигенные сайты состоят из 28 а.о., что составляет 32 и 35% последовательностей АВВІ-Ins и АВВІ соответственно. Из таблицы видно, что разные антигенные детерминанты обладают разными иммуногенными потенциалами, так как они индуцируют образование антител различной авидности. Сайт, состоящий из аминокислот 6-11 (KYSPDP), можно считать иммунодоминантным, так как он индуцирует образование антител самой высокой авидности среди всех исследуемых пептидов. Как видно из исследования препарата антител против альбестина, в случае отсутствия данного иммунодоминантного сайта другие не проявляют активности.

Таблица. Антигенные гексапептиды и антигенные сайты. Жирные буквы обозначают фрагмент интерферона- $\alpha 2$.

Номер гексапептида	Антигенный сайт	Позиция в послед-ти	Послед-ть гексапептида	Активные гексапеп-ды, выявляемые антителами к конструкциям		
				ABBI	ABBI-Ins	ABB
4	1	4-9	EKKYSP	+	+	
5	1	5-10	KKYSPD	++++	+++	-
6	1	6-11	KYSPDP	+++++	++++	-
7	1	7-12	YSPDPG	+++	++	-
8	1	8-13	SPDPGD	++	++	-
9	1	9-14	PDPGDP	++	++	-
10/45	1	10-15(45-50)	DPGDPE	+	+	-
34/69	2	34-39(69-74)	GGTVHV	++	+	-
35/70	2	35-40(70-75)	GTVHVE	+	+	-
36/71	2	36-41(71-76)	TVHVEV	+	++	-
43	3	43-48	PEDPGD	+	+	-
44	3	44-49	EDPGDP	+	+	-

Степень превышения линии отсечения: "-" $A_{405} < (M+58)$; "+" $(M+58) < A_{405} < 2(M+58)$; "++" $2(M+58) < A_{405} < 3(M+58)$; "+++ " $3(M+58) < A_{405} < 4(M+58)$; "++++" $4(M+58) < A_{405} < 5(M+58)$; $A_{405} = A_{405}$ эксперимента- A_{405} контроля

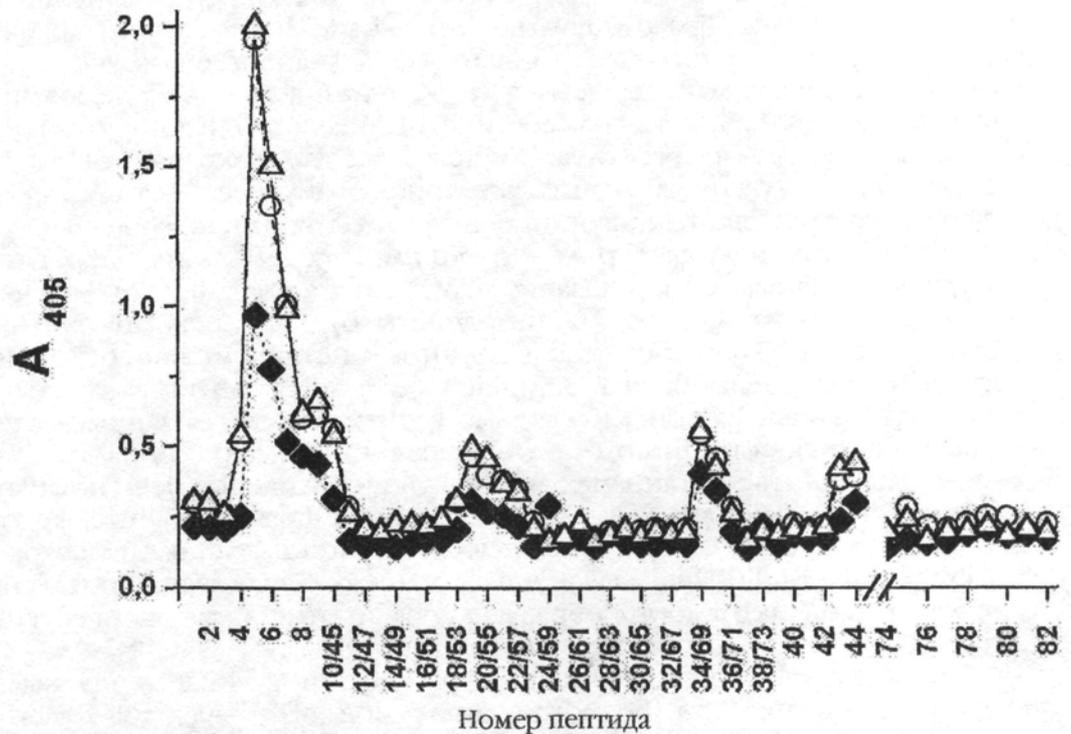


Рисунок 3.

Связывание препарата против альбумина с гексапептидами в отсутствие и в присутствии альбумина и интерферона- $\alpha 2$ в конкурентном ИФА. Взаимодействие антител с гексапептидами без ингибитора (O), в присутствии альбумина (♦) и в присутствии интерферона- $\alpha 2$ (Δ). Концентрации препарата антител, ABBI и интерферона- $\alpha 2$ 150 нМ, 60 нМ и 60 нМ соответственно.

Чтобы проверить специфичность взаимодействия антител, был выполнен конкурентный ИФА гексапептидов с препаратом против альбиферона. Молекулы альбиферона и рекомбинантного человеческого интерферона- α 2 были выбраны в качестве конкурирующего агента. Ингибирование связывания антител с гексапептидами в присутствии альбиферона наблюдалось в различной степени для всех выявленных антигенных сайтов (рис. 3). Присутствие рекомбинантного человеческого интерферона- α 2 не ингибировало связывание антител против альбиферона с гексапептидами, а препараты антител против АВВ1 и TRX-АВВ1-Ins не связывались при ИФА с интерфероном- α 2, сорбированным на пластик (данные не показаны).

В двух из трех белков выявили три непрерывных антигенных сайта, обладающих различным иммуногенным потенциалом (таблица). Хотя молекула альбиферина без биологически активных фрагментов не вызывает образование антител к непрерывным детерминантам, этот белок обладает иммуногенностью. При иммунизации им животных образуются антитела к конформационным детерминантам. Очевидно, что биологически активные фрагменты, присоединенные к искусственному белку-носителю, влияют на иммунологические свойства итоговой конструкции. Три пептида из антигенного сайта 1 (8-15) и два пептида из антигенного сайта 3 (43-49) содержат один общий тетрапептидный фрагмент DPGD. Этот пептид можно рассматривать как один минимальный непрерывный эпитоп альбиферона. Таким образом, первый антигенный сайт состоит по крайней мере из двух антигенных детерминант. Одна (наиболее иммуногенная) является фрагментом интерферона (и, возможно, включает небольшую часть последовательности альбиферина), вторая же состоит только из последовательности альбиферина. Отсутствие антител против DPGD в анти-АВВ1 препарате можно объяснить усилением иммуногенности молекулы альбиферина в результате присоединения фрагмента интерферона.

Хотя иммунизация кур конструкциями, содержащими фрагмент интерферона, вызывает образование антител к содержащим этот фрагмент пептидам, антитела не взаимодействуют с рекомбинантным интерфероном. Отсутствие такого взаимодействия можно объяснить разной топологией общего октапептидного фрагмента в молекулах интерферона и альбиферина. По-видимому, антитела, образованные в ответ на введение искусственного белка с фрагментом интерферона, не будут взаимодействовать в организме с молекулой цитокина. Тем не менее, ранее показано, что альбиферон подобно пептидному фрагменту интерферона проявляет свою биологическую активность путем связывания с рецептором интерферона- α 2 [7]. Для выяснения того, как влияют на проявление биологической активности образующиеся против такой конструкции антитела, необходимы дополнительные эксперименты.

Гексапептиды, соответствующие фрагменту инсулина, не проявляют антигенной активности. Возможно, причиной тому является 100%-ная гомология с молекулами инсулина различных видов животных, в том числе и с куриным инсулином (программа Fasta3, www2.ebi.ac.uk/fasta3).

Таким образом, при антигенном картировании линейных В-эпитопов искусственных белков с частично перекрывающимися последовательностями с использованием антител кур и мышей [9] показана минимальная зависимость антигенных карт от видовых особенностей иммунной системы.

Выявлены три общих линейных В-эпитопа и по одному индивидуальному для каждого вида животных. В то же время титры антител на эти белки у кур ниже, чем у млекопитающих, приблизительно в 100 раз [9].

Все антигенные сайты находятся на границах элементов вторичной структуры и на предполагаемой поверхности молекул. Такое расположение типично для природных белков, но в случае белков *de novo* это может служить косвенным подтверждением, что третичная структура всех трех изучаемых нами искусственных белков близка к предсказанной структуре альбумина.

Авторы выражают благодарность академику РАМН А.И. Арчакову и д.б.н. В.Н. Прозоровскому (НИИ биомедицинской химии РАМН) за ценные рекомендации по выбору пептида с инсулиноподобной активностью для конструирования искусственных белков.

Работа проведена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 00-04-48355).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Regan, L. and DeGrado, W.F.* (1988) *Science* 241, 976-978
2. Долгих Д.А., Кирпичников М.П., Птицын О.Б., Чемерис В.В. (1996) *Мол. биология* 30, 262-273
3. *DeGrado, W.F., Summa, C.M., Pavone, V., Nastro, F., Lombardi, A.* (1999) *Annu. Rev. Biochem.* 68, 779-819
4. Долгих Д.А., Федоров А.Н., Чемерис В.В., Чернов Б.К., Финкельштейн А.В., Шульга А.А., Алахов Ю.Б., Кирпичников М.П., Птицын О.Б. (1991) *Докл. Акад. Наук СССР* 320, 1266-1269
5. *Fedorov A.N., Dolgikh D.A., Chemeris V.V., Chernov B.K., Finkelstein A.V., Schulga A.A., Alakhov Yu.B., Kirpichnikov M.P., Ptitsyn O.B.* (1992) *J. Mol. Biol.* 225, 927-931
6. *Chemeris V.V., Dolgikh D.A., Fedorov A.N., Finkelstein A.V., Kirpichnikov M.P., Uversky V.N., Ptitsyn O.B.* (1994) *Protein Eng.* 7, 1041-1052
7. *Dolgikh D.A., Uversky V.N., Gabriellian A.E., Chemeris V.V., Fedorov A.N., Navolotskaya E.V., Zav'yalov V.P., Kirpichnikov M.P.* (1996) *Protein Eng.* 9, 195-201
8. *Prozorovskiy V.N., Maksimova E.M., Alekseeva A.E., Grebenshikova O.G., Abakumova O.Yu., Kutsenko N.G., Ivanov A.S., Kniazhev V.N., Archakov A.I.* (1999) *Biochem. Mol. Biol. Int.* 47(6), 957-963
9. Бочарова О.В., Мошковский С.А., Черткова Р.В., Колесанова Е.Ф., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. (2002) *Мол. биол.* 36, 1-7
10. *Jenselius, J.C., Andersen, I., Hau, J., Crone, M., and Koch, C.* (1981) *J. Immunol. Methods* 46, 63-68
11. *Laemmli U.* (1970) *Nature* 227, 680-685
12. Аммосова Т.Н., Упоров И.В., Рубцова М.Ю., Игнатенко О.В., Егоров А.М., Колесанова Е.Ф., Арчаков А.И. (1997) *Биохимия* 62(4), 440-447

13. *Kolesanova E.F., Kozin S.A., Rummyantsev A.B., Jung C., Hui Bon Hoa G., Archakov A.I.* (1997) Arch. Biochem. Biophys. 341(2), 229-237

Поступила 10.09.02

**ATTACHMENT OF BIOLOGICALLY ACTIVE FRAGMENTS OF INTERFERON- $\alpha 2$
AND INSULIN TO THE ARTIFICIAL PROTEIN, ALBEBETIN, AFFECTS IMMUNO-
GENICITY OF THE RESULTING CONSTRUCT**

*O.V. Bocharova¹ S.A. Mosbkovskii², R.V. Chertkova¹, Z.Kb. Abdullaev¹,
E.F. Kolesanova², D.A. Dolgikh¹, M.P. Kirpichnikov¹*

¹Russian Academy of Sciences Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, 117997, Moscow, Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7, V-437; Fax: 335-5033; E-mail: obon@nmr.ru

²Russian Academy of Medical Sciences V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, 119992, Moscow, Pogodinskaya 10; fax: 245-0857

The immunogenicity of the artificial protein albebetin and its derivatives with active peptide fragments was investigated. We also studied the influence of the peptides on the immunogenicity of the whole construct and contribution of each component to the immunogenicity. Two of three studied proteins contained active peptides from human IFN- α and insulin. Three continuous antigenic sites with different immunogenic potential were recognized in the chimerical proteins. The interferon fragment was the immunodominant site in the albeferon and albeferon-insulin molecules, while the insulin fragment displayed low immunogenic activity. All continuous B-epitopes are located at the boundaries of the secondary structure elements and at the predicted surface-located sites of albebetin molecule. Thus, peptide fragments attached to the artificial protein carrier can influence immunogenicity of the resulting construct.

Keywords: artificial proteins, B-epitope mapping, immunogenicity