

Противовирусные свойства новых искусственных белков, созданных на основе альбиферона и фрагмента LKDRHDF (30—36) из интерферона- α_2 человека

Р. В. Черткова, Н. А. Степаненко, Д. А. Долгих

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН
Ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, 117997, Россия

Настоящая работа посвящена получению и исследованию биологических свойств двух искусственных белков с заданной функцией, созданных путем включения фрагмента LKDRHDF (30—36) из интерферона- α_2 человека в N- и C-концевые последовательности альбиферона—искусственного белка с заданной структурой и функцией. На клеточных культурах L-41 и VERO показано, что оба белка обладают противовирусной активностью и практически не обнаруживают цитотоксических свойств.

Введение. Альбиферон [1] получен путем введения в N-концевую последовательность альбобетина — искусственного белка с заданной структурой [2] — пептидного фрагмента LKEKKYSP (130—137, петля DE) [3], расположенного в консервативной части молекулы ИФН- α_2 и участвующего в формировании специфического центра связывания с рецептором интерферона [4]. Показано, что альбиферон обладает более высокой по сравнению с нативным ИФН- α_2 blast-трансформирующей активностью [1], а также более компактной и стабильной структурой альбобетина [5]. В настоящей работе получены два варианта (ABVI-II и ABVI-I) альбиферона, содержащего последовательность из ИФН- α_2 LKDRHDF (30—36, петля AB). — второго фрагмента, участвующего в образовании центра взаимодействия с рецептором [4], — в N- и C-концевых последовательностях соответственно.

Материалы и методы. В работе использовали реактивы производства фирм «ICN», «Sigma», «Serva», «Bio-Rad» (США); «Реакхим» (Россия). Олигонуклеотиды синтезированы твердофазным фосфоамидитным методом в УНЦ ИБХ им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН.

Конструирование векторов. Генно-инженерные работы выполняли по стандартным методикам

[6]. Введение олигонуклеотида, кодирующего фрагмент LKDRHDF из ИФН- α_2 , в ген альбиферона проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

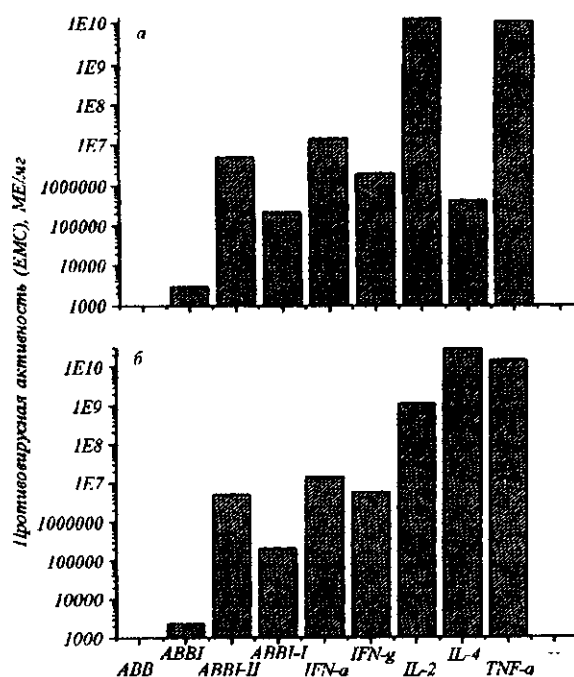
Экспрессия рекомбинантных генов и выделение искусственных белков. Экспрессию осуществляли в клетках штамма *Escherichia coli* BL-21 (DE3) pLysS («Novagen», США) в среде TB с антибиотиками [5]. Белки выделяли с помощью хроматографии на анионообменном (Mono Q HR, «Bio-Rad», США) и металл-хелатном (Ni-NTA-SF, «Qiagen», США) сорбентах. Протеолиз гибридного белка протеазой «фактор Ха» («New England Biolabs», США) и очистку целевых белков на Ni-NTA-SF проводили согласно протоколам фирм-изготовителей.

Определение противовирусных и цитотоксических свойств. Клетки линий L-41 (мононуклеарного лейкоза человека) и VERO (клетки почки зеленой мартышки) культивировали в атмосфере 5 % CO₂ при температуре 37 °С в среде RPMI-1640 с 10 мМ HEPES, 0,2 % NaHCO₃, 2 мМ L-Gln, 2 мМ пируват натрия, 50 мкг/мл гентамицина, 10 %-й эмбриональной сывороткой теленка. Концентрация клеток для инициации роста составляла 2·10⁵ клеток в 1 мл. Противовирусную активность препаратов определяли по минимальной концентрации, при которой наблюдается задержка цитопатического действия (ЦПД₅₀) тест-вируса энцефало-

миокардита мышей (EMC) на 50 % [7]. Цитотоксические дозы (ЦТД₅₀) определяли аналогично, но в отсутствие вируса [7].

Результаты и обсуждение. Олигонуклеотид, кодирующий фрагмент LKDRHDF из ИФН- α_2 , вводили в области гена альбегферона, соответствующие N- и C-концевым последовательностям альбегферона, путем амплификации в ходе ПЦР обеих цепей плазмидной ДНК. В качестве матричной ДНК для ПЦР использовали вектор pET32 LIC («Novagen»), несущий ген альбегферона под контролем промотора бактериофага T7 совместно с геном тиоредоксина и участками, кодирующими шесть остатков His и участок узнавания IEGR протеазы «фактор Ха». В ходе оптимизации экспрессии генов в клетках *E. coli* подобраны условия, при которых максимальный выход гибридных белков составлял 80–100 мг на 1 л клеточной суспензии. Разработанная схема выделения белков включала этапы хроматографии на анионообменном и металл-хелатном сорбентах, расщепление протеазой «фактор Ха», очистку целевого белка на металл-хелатном сорбенте и позволяла получать до 12 мг/л клеточной суспензии. Согласно данным масс-спектрометрии, значения молекулярных масс полученных белков отвечали рассчитанным (9,3 и 9,8 кДа для АВБИ-I и АВБИ-II соответственно). Гомогенность полученных препаратов была подтверждена анализом последовательности девяти N-концевых аминокислотных остатков Met-Leu-Lys-Glu-Lys-Lys-Tyr-Ser-Pro-.

При тестировании биологических свойств продемонстрировано наличие потенциальной противовирусной активности у двух вариантов искусственного белка (рисунок, а и б). Однако в обеих клеточных культурах активность АВБИ-I, в котором фрагмент LKDRHDF располагается в C-концевой последовательности альбегферона, на порядок ниже по сравнению с АВБИ-II, в котором фрагмент располагается в N-концевой последовательности после LKEKKYSP. По-видимому, расположение пептидных фрагментов в варианте АВБИ-II в большей степени способствует формированию специфического центра, необходимого для эффективного связывания с рецептором интерферона. Эффективность действия АВБИ-II на обеих клеточных культурах сопоставима с действием препаратов ИФН- α_2 , ИФН- γ и вместе с тем заметно ниже по сравнению с интерлейкинами IL-2, IL-4 и фактором некроза опухоли человека (TNF- α). Альбегферон, использованный в качестве стандарта, также обнаружил слабые противовирусные свойства, которые, по-видимому, опосредованы наличием у него иммуномодулирующей активности. Все четыре искусственных белка проявляли цитотоксические свойства лишь при сравнительно высоких концентрациях (таблица).



Противовирусная активность искусственных белков. Противовирусные свойства в культурах клеток VERO (а) и L-41 (б) определены по минимальной концентрации препарата, вызывающей задержку цитопатического действия вируса EMC на 50 %. Приведены средние значения трех независимых экспериментов; стандартные отклонения не превышали 47 %

Цитотоксические свойства искусственных белков

Тестируемый препарат	Цитотоксическая доза, М	
	Клетки VERO	Клетки L-41
Альбегетин (ABB)	$\geq 8,5 \cdot 10^{-5}$	$\geq 8,7 \cdot 10^{-5}$
Альбегферон (ABBI)	$\geq 8,8 \cdot 10^{-5}$	$\geq 8,8 \cdot 10^{-5}$
ABBI-II	$\geq 9,0 \cdot 10^{-5}$	$\geq 8,9 \cdot 10^{-5}$
ABBI-I	$\geq 1,2 \cdot 10^{-4}$	$\geq 1,4 \cdot 10^{-4}$

Примечание. Приведены цитотоксические дозы, определяемые как минимальные концентрации препаратов, вызывающие деструкцию 50 % клеточного монослоя в отсутствие вируса EMC.

Таким образом, в результате работы сконструированы два искусственных белка с заданными противовирусными свойствами. Получены генно-инженерные конструкции и разработана эффективная система биосинтеза, выделения и очистки этих белков, что позволило наработать оба варианта в

количествах, достаточных для анализа антивирусных и цитотоксических свойств. Показано, что оба белка обладают антивирусной активностью, что позволяет предположить возможность использования этих белковых препаратов в биотехнологии, фармакологии и биомедицине. Полученные результаты служат основанием для дальнейших исследований (как *in vitro*, так и *in vivo*) биологических свойств наших белков, а также изучения их структурных особенностей.

Авторы выражают благодарность В. П. Завьялову за предложение использовать фрагмент (30—36) из ИФН- α_2 для конструирования искусственных белков, а также В. М. Абрамову и М. В. Мезенцевой — за ценные советы и помощь при исследовании биологической активности белков.

R. V. Chertkova, N. A. Stepanenko, D. A. Dolgikh

Antiviral properties of *de novo* designed proteins based on the albeferon and the fragment LKDRHDF (30—36) from human interferon- α_2

Summary

Two biologically active *de novo* proteins, ABBI-II and ABBI-I, were engineered by including the fragment LKDRHDF (30—36) from human interferon- α_2 (HuIFN- α_2) into the N- and C-termini of albeferon — *de novo* protein with pre-designed structure and function. It was shown that both proteins prevented the destruction of the L-41 and VERO cell monolayers generated by cytopathical action of a virus with the efficiency of native HuIFN- α_2 and did not possess cytotoxicological properties.

P. V. Chertkova, N. O. Stepanenko, D. A. Dolgikh

Противірусні властивості нових штучних білків, створених на основі альбеферону і фрагмента LKDRHDF (30—36) з інтерферону α_2 -людини

Резюме

Роботу присвячено отриманню і дослідженню біологічних властивостей двох штучних білків із заданою функцією, створе-

них шляхом включення фрагмента LKDRHDF (30—36) з інтерферону α_2 -людини в N- і C-кінцеві послідовності альбеферону — штучного білка з заданою структурою і функцією. На клітинних культурах L-41 та VERO показано, що обом білкам притаманна противірусна активність і вони майже зовсім не проявляють цитотоксичних властивостей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dolgikh D. A., Uversky V. N., Gabrielyan A. E., Chemeris V. V., Fedorov A. N., Navolotskaya Y. V., Zav'yalov V. P., Kirpichnikov M. P. The *de novo* protein with grafted biological function: transferring of the interferon blast-transforming activity to albebetin // Protein Eng.—1996.—9, N 2.—P. 195—201.
2. Fedorov A. N., Dolgikh D. A., Chemeris V. V., Chernov B. K., Finkelstain A. V., Schulga A. A., Alakhov Yu. B., Kirpichnikov M. P., Ptitsyn O. B. *De novo* design, synthesis and study of albebetin, a polypeptide with a predetermined three-dimensional structure // J. Mol. Biol.—1992.—225.—P. 927—931.
3. Zav'yalov V. P., Navolotskaya E. V., Vasilenko R. N., Abramov V. M., Volodina E. Y., Roslovtseva O. A., Prusakov A. N., Kurov O. A. The sequence 130—137 of human interferon- α_2 is involved in the competition of interferon, prothymosin and holera toxin B subunit for common receptors on human fibroblasts // Mol. Immunol.—1995.—32, N 6.—P. 425—431.
4. Zav'yalov V. P. Interferons α/β and their receptors: from structure-function studies to the design of *de novo* protein with the grafted active site of human interferon- α_2 // Proc. of the first ISTC Symp. «Immunoglobulins, molecular chaperones and immunity».—Turku, 1995.—P. 45—68.
5. Aphisheva I. Yu., Dolgikh D. A., Abdullaev Z. K., Uversky V. N., Kirpichnikov M. P., Ptitsyn O. B. Can grafting of an octapeptide improve of a *de novo* protein? // FEBS Lett.—1998.—N 425/1.—P. 101—104.
6. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1982.
7. Чихов Н. П., Еришов Ф. И., Индулен М. К. Основы экспериментальной химиотерапии вирусных инфекций.—Рига: «Зинатне», 1988.

УДК 577.322

Надійшла до редакції 22.10.01