



ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА Fab-ФРАГМЕНТА МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА LNKВ-2 С АНТИГЕННЫМ НОНАПЕПТИДОМ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 ЧЕЛОВЕКА¹

© 2023 г. Е. А. Горячева*, #, И. В. Артемьев*, Н. В. Плетнева*, В. З. Плетнев*

*ФГБУН “Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 27.06.2022 г.

После доработки 09.08.2022 г.

Принята к публикации 12.08.2022 г.

Рентгеноструктурным методом при разрешении 2.6 Å установлена пространственная структура антигенсвязывающего фрагмента (Fab) моноклонального антитела LNKВ-2 в комплексе с синтетическим антигенным нонапептидом интерлейкина-2 человека (IL-2; Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu-O) в кристаллической пространственной группе P2₁2₁2₁. Пептид принимает несколько искаженную α-спиральную конформацию, близкую к таковой фрагмента 64–72 антигена IL-2. Четыре из шести гипервариабельных петель антигенсвязывающего сайта Fab-фрагмента участвуют в связывании нонапептида посредством водородных связей, солевых мостиков и гидрофобных взаимодействий, причем важную роль в распознавании антигена играют остатки Туг антитела.

Ключевые слова: моноклональное антитело, Fab-фрагмент, антиген интерлейкина-2, пространственная структура, рентгеноструктурный анализ

DOI: 10.31857/S0132342323010098, EDN: GFDHXS

ВВЕДЕНИЕ

Моноклональные антитела широко используются в биомедицинских исследованиях. Они обладают уникальной специфичностью к антигену за счет пространственной комплементарности в контактной области с образованием системы стабилизирующих водородных связей, солевых мостиков, электростатических и гидрофобных взаимодействий [1–3]. Информация о строении комплексов антител с белками и отдельными эпитопами вызывает значительный практический интерес. Изучение структурных основ специфичности связывания антиген–антитело внесло важный вклад в понимание механизма иммунного узнавания и рационального дизайна синтетических вакцин. Развитию этой области в значительной степени способствовали рентгеноструктурные исследования изолированных антител и антигенов, а также их комплексов [4].

Интерлейкин-2 (IL-2) человека — один из главных регуляторов иммунной системы, отвечающий за рост и дифференцировку активированных антигеном Т- и В-лимфоцитов [5, 6], он рассматривается как перспективное терапевтическое средство при вторичных иммунодефицитах. Моноклональное антитело LNKВ-2 относится к классу иммуноглобулинов IgG1 и взаимодействует с IL-2 с высокой аффинностью, характеризующейся величиной константы связывания $\sim 3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ [7]. Структурные исследования специфики межмолекулярного взаимодействия в комплексах антиген–антитело выступают одним из важных направлений иммунологии.

Ранее были опубликованы результаты рентгеноструктурных исследований свободного Fab-фрагмента моноклонального антитела LNKВ-2 к IL-2 человека в кристаллической пространственной группе P2₁2₁2₁ [8, 9], а также его комплекса с синтетическим 9-членным антигенным пептидом (64–72) IL-2 в пространственной группе P2₁ при разрешении 3 Å [10]. В настоящей работе приведены результаты рентгеноструктурного изучения аналогичного комплекса с антигенным нонапептидом IL-2 в новой пространственной группе P2₁2₁2₁ при более высоком разрешении 2.6 Å.

¹ Статья посвящается памяти академика РАН Иванова Вадима Тихоновича.

Сокращения: Fab — антигенсвязывающий фрагмент; IL-2 — интерлейкин-2; RMSD — среднеквадратичное отклонение.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 330-75-10; эл. почта: goryacheva@ibch.ru).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пространственная организация. Пространственная структура Fab-фрагмента LNKВ-2 сформирована из четырех β -структурных доменов — двух вариабельных (V_L и V_H) и двух константных (C_L и C_H), образованных легкой (L) и частью тяжелой (H) цепей (рис. 1–3). Каждый из доменов имеет характерную для иммуноглобулинов укладку цепи, представленную двумя скрученными β -слоями с антипараллельной структурой. Существенный вклад в стабилизацию структуры вносят пять ковалентных S–S-связей между остатками Cys, из них четыре внутрицепочечные 23–88 (V_L), 134–194 (C_L), 22–92 (V_H), 142–208 (C_H) и одна межцепочечная 214 (C_L) – 230 (C_H). Характерная особенность структуры — наличие шести *цис*-пептидных связей, предшествующих

остаткам пролина 8, 95, 141 в цепи L и 149, 151, 202 в цепи H.

Топология укладки полипептидных цепей в структуре комплекса Fab-LNKВ-2 с антигенным пептидом IL-2 человека в кристаллической пространственной группе $P2_12_12_1$ в целом близка к таковой в структуре ранее опубликованного комплекса в группе $P2_1$ [10]. Среднеквадратичное отклонение (RMSD) C^α -атомов всей структуры, отдельно антигенного пептида, легкой и тяжелой цепей обеих структур составило 0.745, 0.277, 0.574 и 0.871 Å соответственно. Более высокое разрешение структуры в группе $P2_12_12_1$ позволило уточнить геометрию отдельных областей комплекса. Наибольшее отличие по всем атомам продемонстрировал 9-членный антигенный пептид IL-2 (RMSD 1.713 Å).

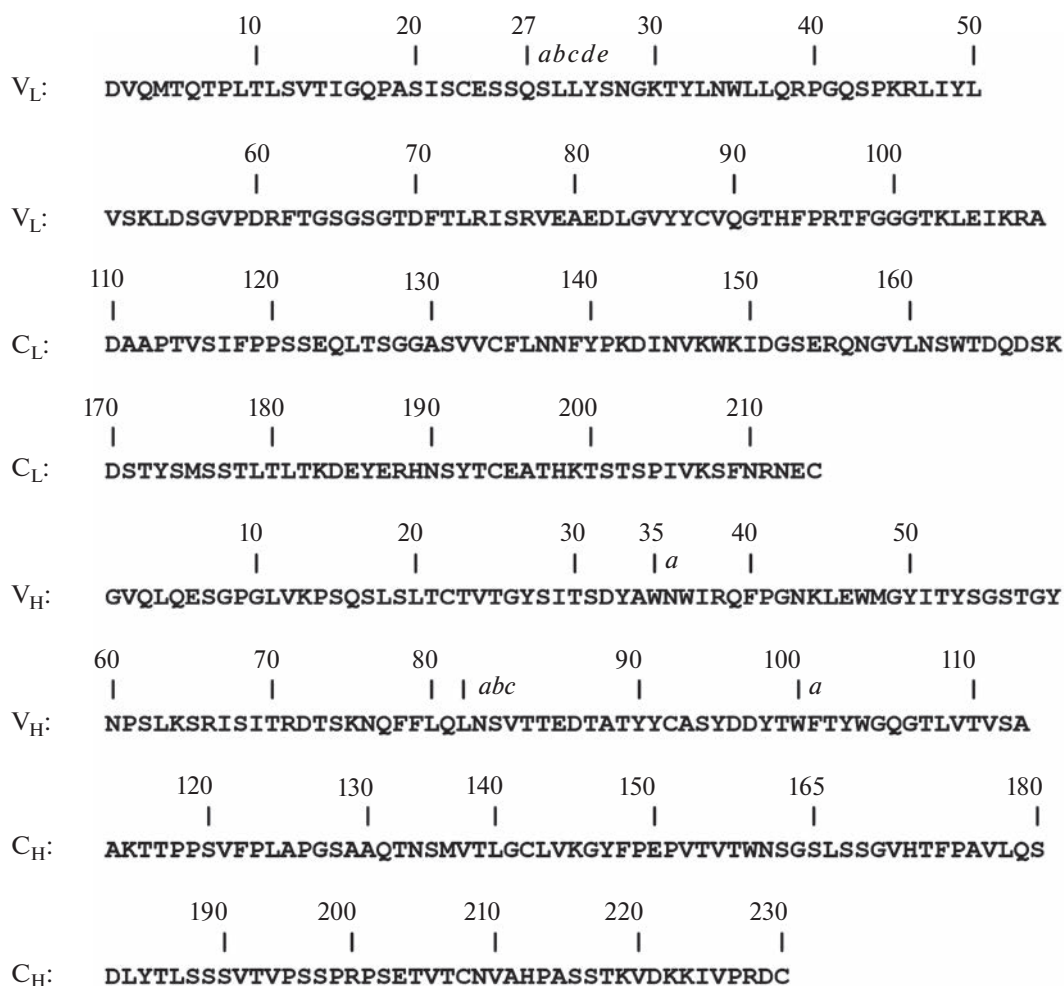


Рис. 1. Аминокислотная последовательность легкой цепи (L) и фрагмента тяжелой цепи (H) Fab-фрагмента антитела LNKВ-2 с обозначением вариабельных (V) и константных доменов (C). Нумерация остатков дана по номенклатуре Kabat et al. [11]; строчными курсивными буквами помечены остатки, сохраняющие номер предшествующего остатка.

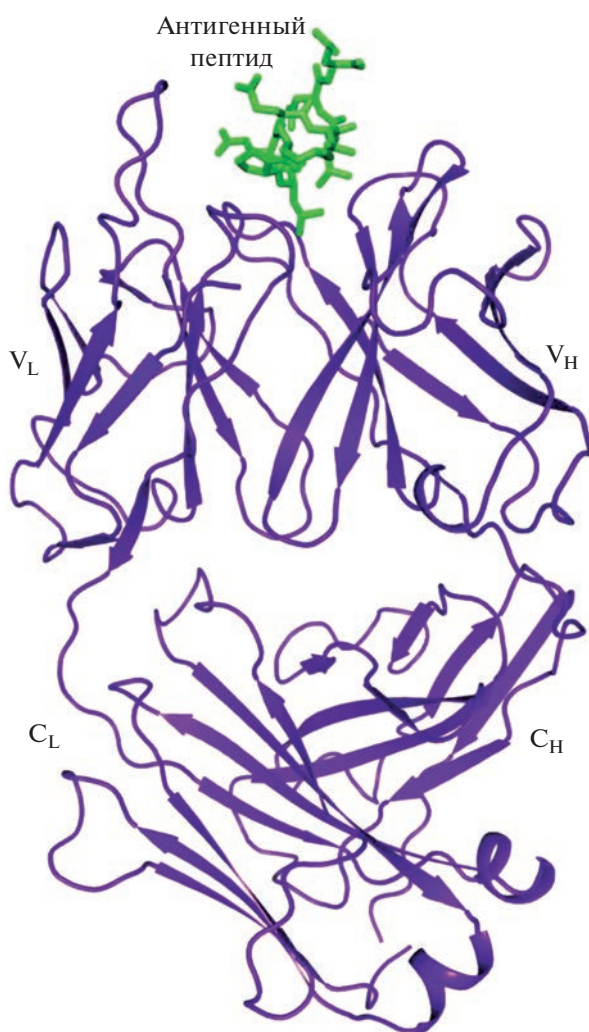


Рис. 2. Топология пространственной укладки комплекса Fab-фрагмента антитела LNKB-2 к IL-2 человека (показан фиолетовым цветом) с антигенным пептидом IL-2 (зеленый цвет).

Антигенсвязывающий центр. В формировании антигенсвязывающего центра Fab-LNKB-2 участвуют шесть гипервариабельных областей легкой и тяжелой цепей, по три от каждого V_L - и V_H -доменов, расположенных на петлевых участках с нерегулярной структурой. Нонапептидный фрагмент Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu-O (64–72) эпитопа IL-2 принимает неидеальную форму α -спирали и связывается четырьмя гипервариабельными петлями, одна из которых принадлежит легкой (V_L) и три — тяжелой (V_H) цепям. Связывание пептида осуществляется за счет образования одного солевого мостика, четырех Н-связей и ряда гидрофобных ван-дер-ваальсовых контактов (табл. 1).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение Fab-фрагментов. Fab-фрагменты моноклонального антитела LNKB-2 к IL-2 человека получали по методике, описанной в работе Фокина с соавт. [8]. Для наработки препаративных количеств антител гибридные клетки LNKB-2 вводили мышам линии BALB/c. Выделенную асцитную жидкость подвергали очистке, раствор антител мышей диализовали против буфера, содержащего 25 мМ Tris-HCl (pH 7.3), 250 мМ NaCl, 1 мМ EDTA и 25 мМ меркаптоэтанол. Fab-LNKB-2 получали гидролизом моноклональных антител папаином. После очистки на колонке с DEAE-целлюлозой проводили препаративное разделение Fab-фрагментов на отдельные изоформы ме-

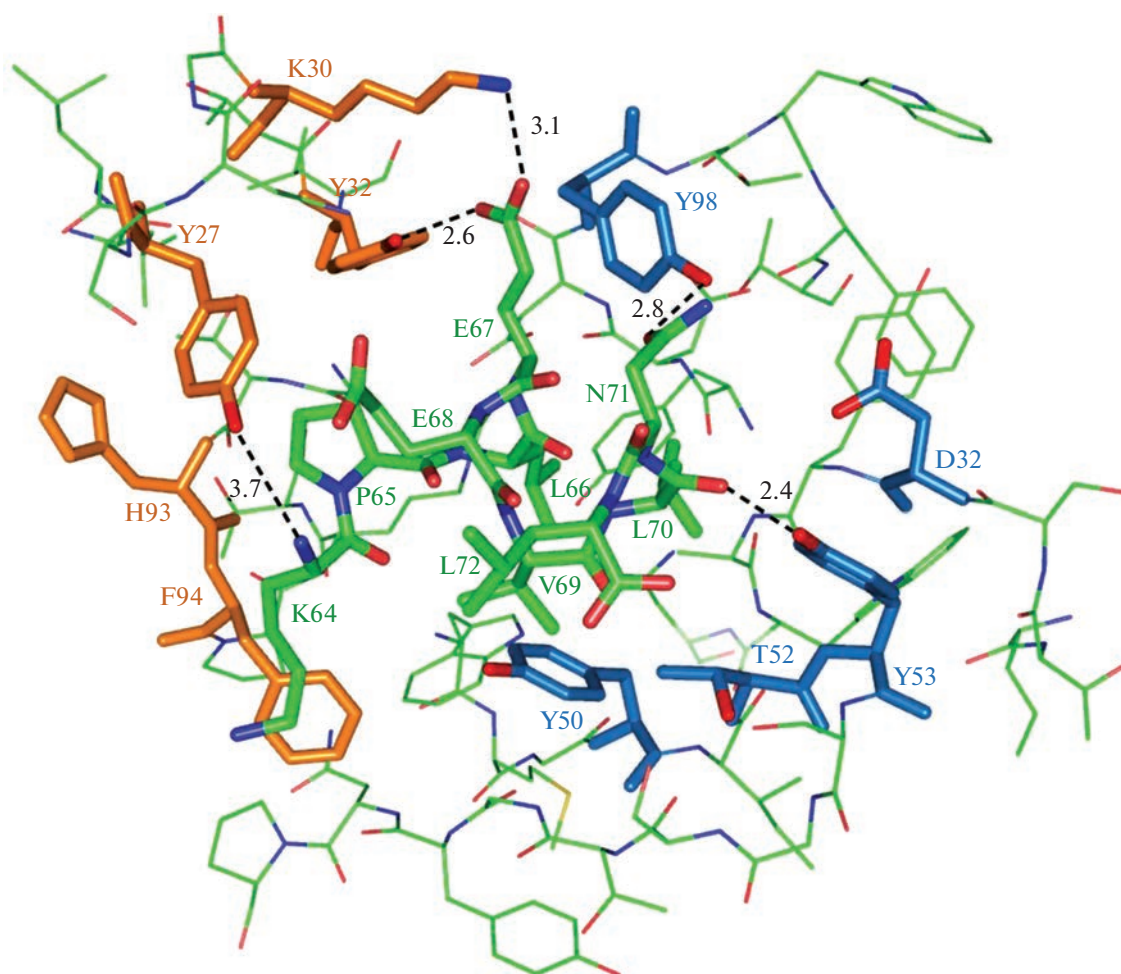


Рис. 3. Структура антигенсвязывающего центра Fab-фрагмента антитела LNKВ-2 к IL-2 человека (легкая и тяжелая цепи показаны, соответственно, оранжевым и синим цветами) в комплексе с антигенным пептидом IL-2 (зеленый цвет). Расстояния приведены в ангстремах.

Таблица 1. Стабилизирующие контакты Fab-фрагмента антитела LNKВ-2 в комплексе с антигенным пептидом IL-2: водородные связи и солевые мостики*

Антигенный пептид	Fab-фрагмент	Расстояние, Å
Lys64	Tyr27d (V _L)	3.65
Glu67	Tyr32 (V _L)	2.59
*Glu67	*Lys30 (V _L)	3.05
Asn71	Tyr98 (V _H)	2.85
Leu70 (C=O)	Tyr53 (V _H)	2.43

Таблица 2. Экспериментальные кристаллографические данные и статистика уточнения структуры комплекса Fab-LNKB-2

Кристаллографические параметры	
Пространственная группа	$P2_12_1$
Параметры ячейки (Å, град)	$a = 71.94, b = 72.22,$ $c = 88.33$
$Z(Z')$	4(1)
Область разрешения, Å	20.00–2.60
Число рефлексов	11 823
Полнота набора, %	69.4
R_{work}	0.158
R_{free}	0.240
Свободные рефлексы, %	7.7
Неводородные атомы модели	
Белковый комплекс	3454
Вода	53
RMSD от идеальных значений	
Длина связей, Å	0.005
Валентные углы, град	0.771
Торсионные углы (период 3), град	16.3
Хиральность, Å ³	0.037
Атомные плоскости, Å	0.004
Конформационная статистика Рамачандрана, %	
Предпочтит./разрешен./отклонения	93.9/4.3/1.8

тодом изоэлектрофокусирования. Фракция Fab-фрагментов с $pI \sim 8.1$ была использована для кристаллизации.

Кристаллизация и получение рентгеновских экспериментальных данных. Кристаллы комплекса Fab-LNKB-2 и синтетического пептида IL-2 (Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu-O [12]) выращивали в варианте висячей капли при концентрации белка ~ 15 мг/мл из 10%-ного полиэтиленгликоля 4000, 7%-ного 2-пропанола, 60 мМ Na-HEPES (pH ~ 7.6). Рентгеновские экспериментальные данные получали на дифрактометре SC XRD (Bruker, Германия) с разрешением 2.6 Å. Кристаллографические данные и статистика уточнения приведены в табл. 2.

Определение структуры. Пространственная структура Fab-LNKB-2 была установлена мето-

дом молекулярного замещения с помощью программы Molrep [13] с использованием в качестве модели установленную ранее структуру комплекса Fab-LNKB-2 в альтернативной пространственной группе $P2_1$ [10]. Последующее кристаллографическое уточнение структуры проводили с помощью программы Refmac [14] попеременно с ручной правкой модели в электронной плотности с использованием программы Coot [15]. Координаты атомов структуры депонированы в международном банке белковых структур PDB с кодом доступа 7YZJ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлена пространственная структура Fab-фрагмента моноклонального антитела LNKB-2 к IL-2 человека в комплексе с антигенным нонапептидом IL-2 рентгеноструктурным методом в новой кристаллической пространственной группе $P2_12_1$ при разрешении 2.6 Å. Новая структура, по сравнению с ранее установленной в группе $P2_1$ при разрешении 3.0 Å, характеризуется повышенной точностью локализации атомов. Антигенный пептид в спиральной форме располагается в полости, образованной гипервариабельными участками тяжелой и легкой цепей Fab-фрагмента и специфически связывается четырьмя Н-связями, одним солевым мостиком и рядом гидрофобных взаимодействий.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено по теме 0101-2019-0016 госзадания ФГБУН “Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sela-Culang I., Kunik V., Ofra Y. // Front. Immunol. 2013. V. 4. P. 302.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00302>
2. Burkovitz A., Leiderman O., Sela-Culang I., Byk G., Ofra Y. // J. Immunol. 2013. V. 190. P. 2327–2334.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200757>

3. *Kapingidza A.B., Kowal K., Chruszcz M.* // *Subcell. Biochem.* 2020. V. 94. P. 465–497.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-41769-7_19
4. *King M.T., Brooks C.L.* // *Methods Mol. Biol.* 2018. V. 1785. P. 13–27.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7841-0_2
5. *Smith K.A.* // *Science.* 1988. V. 240. P. 1169–1176.
<https://doi.org/10.1126/science.3131876>
6. *Smith K.A.* // *Curr. Opin. Immunol.* 1992. V. 4. P. 271–276.
[https://doi.org/10.1016/0952-7915\(92\)90076-q](https://doi.org/10.1016/0952-7915(92)90076-q)
7. *Lunev V.E., Lukin Yu.V., Kazannykh N.V., Belyaev S.V., Zubov V.P., Nesmeyanov V.A.* // *Biomed. Sci.* 1990. V. 1. P. 68–72.
8. *Фокин А.В., Афонин П.В., Михайлова И.Ю., Цыганник И.Н., Мареева Т.Ю., Несмеянов В.А., Пэнгборн В., Ли Н., Дюэкс В., Сижак Е., Плетнев В.З.* // *Биоорг. химия.* 2000. Т. 26. С. 571–578. [*Fokin A.V., Afonin P.V., Mikhailova I.Yu., Tsygannik I.N., Mareeva T.Yu., Nesmeyanov V.A., Pangborn W., Lee N., Duax W., Ciszak E., Pletnev V.Z.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2000. V. 39. P. 512–519.]
<https://doi.org/10.1007/BF02758622>
9. *Плетнев В.З., Горячева Е.А., Цыганник И.Н., Несмеянов В.А., Плетнев С.В., Пэнгборн В., Дюэкс В.* // *Биоорг. химия.* 2004. Т. 30. С. 466–469. [*Pletnev V.Z., Goryacheva E.A., Tsygannik I.N., Nesmeyanov V.A., Pletnev S.V., Pangborn W., Daux W.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2004. V. 30. P. 417–420.]
<https://doi.org/10.1023/b:rubi.0000043783.73562.ef>
10. *Afonin P.V., Fokin A.V., Tsygannik I.N., Mikhailova I.Yu., Onoprienko L.V., Mikhaleva I.I., Ivanov V.T., Mareeva T.Yu., Nesmeyanov V.A., Li N., Pangborn W.A., Duax W.L., Pletnev V.Z.* // *Protein Sci.* 2001. V. 10. P. 1514–1521.
<https://doi.org/10.1110/ps.3101>
11. *Kabat E.A., Wu T.T., Perry H.M., Gottesman K.S., Foeller C.* // *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, 1991.
12. *Оноприенко Л.В., Михалева И.И., Иванов В.Т., Войтенков Б.О., Окулов В.Б.* // *Биоорг. химия.* 1996. Т. 22. С. 180–190. [*Onoprienko L.V., Mikhaleva I.I., Ivanov V.T., Voitenkov B.O., Okulov V.B.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 1996. V. 22. P. 156–165.]
13. *Vagin A., Teplyakov A.* // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2010. V. 66. P. 22–25.
<https://doi.org/10.1107/S0907444909042589>
14. *Murshudov G.N., Skubák P., Lebedev A.A., Pannu N.S., Steiner R.A., Nicholls R.A., Winn M.D., Long F., Vagin A.A.* // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2011. V. 67. P. 355–367.
<https://doi.org/10.1107/S0907444911001314>
15. *Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K.* // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2010. V. 66. P. 486–501.
<https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>

Three-Dimensional Structure of Fab Fragment of Monoclonal Antibody LNKБ-2 Complexed with Antigenic Nonapeptide from Human Interleukin-2

E. A. Goryacheva*,[#], I. V. Artemyev*, N. V. Pletneva*, and V. Z. Pletnev*

[#]Phone: +7 (495) 330-75-10; e-mail: goryacheva@ibch.ru

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

The three-dimensional structure of the antigen-binding fragment (Fab) of the monoclonal antibody LNKБ-2 in complex with the synthetic antigenic nonapeptide of human interleukin-2 (IL-2; Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu-O) was determined by X-ray method at a resolution of 2.6 Å in crystal space group P2₁2₁2₁. The peptide adopts a somewhat distorted α-helical conformation, close to that of fragment 64–72 of the IL-2 antigen. Four out of the six hypervariable loops in the antigen-binding site of the Fab fragment are involved in nonapeptide association through hydrogen bonding, salt bridge formation, and hydrophobic interactions. Moreover, Tyr residues of an antibody play an important role in antigen-antibody recognition.

Keywords: monoclonal antibody, Fab fragment, interleukin-2 antigen, three-dimensional structure, X-ray study