



УДК 577.112.083.3:577.27

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АНТИ-TNF- α -МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ E7H2 С МУТАНТНЫМИ И ГИБРИДНЫМИ БЕЛКАМИ

© 1997 г. Л. Н. Шингарова, Л. Н. Сагайдак, Н. П. Беркова, В. Г. Коробко[#]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 27.11.96 г.

Генно-инженерными методами получен ряд химерных белков, содержащих аминокислотные последовательности человеческого лимфотоксина (TNF- β), факторов некроза опухолей человека (hTNF- α) и мыши (mTNF- α). С их помощью определена локализация на молекуле hTNF- α антигенной детерминанты для полученных ранее моноклональных антител E7H2 (Mab E7H2) против фактора некроза опухолей человека. По результатам Вестерн-блот-анализа, сайт связывания с антителами расположен в районе 37–49 молекулы hTNF- α и включает в себя последовательность Val⁴¹GluLeuArg⁴⁴, непосредственно участвующую во взаимодействии с Mab E7H2.

Ключевые слова: фактор некроза опухолей (hTNF- α), лимфотоксин (hTNF- β), гибридные белки, экспрессия в *E. coli*, моноклональные антитела.

Изучение взаимодействия Mab с антигенами представляет большой интерес не только как часть проблемы молекулярных основ высокоспецифического узнавания различных биомолекул. Mab являются важным инструментом структурно-функционального анализа их лигандов [1]. Наиболее распространенные подходы к картированию антигенных детерминант белков основываются на анализе взаимодействия Mab с эволюционно родственными белками или на химической модификации молекулы антигена с ее последующим расщеплением, разделением образующихся фрагментов хроматографическими методами и идентификацией пептидов, сохранивших способность к взаимодействию с Mab [2–4]. Достижения последних лет в области генной и белковой инженерии открывают новые перспективы в этом направлении.

Фактор некроза опухолей (TNF- α) – это полифункциональный цитокин, продуцируемый главным образом активированными макрофагами и моноцитами [5]. Первоначально он был охарактеризован как белок, вызывающий некроз экспериментальных опухолей у мышей [6]. К настоящему времени установлено, что TNF- α является важным медиатором воспалительных процессов при различных инфекциях и аутоиммунных заболеваниях и вызывает сильные системные эффекты, вплоть до септического шока [7]. Системные эффекты ограничивают его использование как

противоопухолевого агента [8], хотя разработаны методы его местного применения при лечении меланом и сарком конечностей в комбинации с интерфероном- γ и химиотерапией при регионарной перфузии [9]. В связи с медико-биологической значимостью этого цитокина существует необходимость определения уровня TNF- α при патологических состояниях и противоопухолевой терапии. Ранее нами были получены высокоаффинные моноклональные антитела E7H2 к рекомбинантному TNF- α человека [10]. На основе этих антител впоследствии были созданы бифункциональные антитела к hTNF- α и пероксидазе хрена и разработана тест-система для быстрой детекции этого цитокина [11].

Ключевая роль TNF- α в основных процессах иммунного ответа стимулировала многочисленные исследования по взаимосвязи его структуры и функции [12]. В попытке получить дополнительную информацию о функциональной топографии молекулы TNF- α мы исследовали взаимодействие этого белка и его мутантов с Mab E7H2.

Для определения аминокислотной последовательности, ответственной за связывание Mab E7H2 с молекулой hTNF- α , мы избрали генно-инженерный подход, а именно получение – с помощью специально сконструированных плазмид – химерных белков, которые содержат различные участки фактора некроза опухолей человека.

На первом этапе работы необходимо было оценить, в какой части молекулы – N- или C-концевой – расположена антигенная детерминанта. С этой целью были получены плазмиды pTNF90, pTNFab и pTNFba, кодирующие укороченный с

Сокращения: hTNF- α – фактор некроза опухолей человека, mTNF- α – фактор некроза опухолей мыши, hTNF- β – лимфотоксин человека, Mab – моноклональные антитела.

[#] Автор для переписки (e-mail: korobko@ibch.siocb.ras.ru).

N-конца вариант hTNF- α и гибриды hTNF- α с hTNF- β . Источниками генов послужили полученные ранее плазмиды pTNF331 [13], pTNF336 [14] и pLT21 [15] (рис. 1), эффективно синтезирующие соответственно hTNF- α , его мутант и человеческий лимфотоксин (hTNF- β). В этих плаزمиде гены цитокинов поставлены под контроль тандема промоторов A₂ и A₃ из ранней области бактериофага T7 и синтетической последовательности Шайна-Дальгарно. Кроме того, плаزمиды pTNF336 содержит точечную мутацию в гене *hinfA*, приведшую к образованию сайта узнавания *PstI*.

Плазмиды pTNF90 была получена в результате трехкомпонентного лигирования *MspI-HindIII*-фрагмента, *HindIII-XhoI*-векторной части pTNF331 и *XhoI-MspI*-синтетического дуплекса (рис. 1) с делецией фрагмента гена, кодирующего участок 7–28. Генные конструкции, кодирующие гибриды hTNF- α с hTNF- β , получили рекомбинацией плазмид pTNF336 и pLT21 по сайту *PstI* (рис. 1). Так как каждая исходная плазмиды содержала два *PstI*-сайта, рекомбинантные плазмиды pTNFab и pTNFba были получены в результате трехкомпонентного лигирования, как описано в “Экспериментальной части”. Плазмиды pTNFab кодировала гибрид, который содержит фрагмент 3–125 hTNF- α и 126–171 лимфотоксина. Белок, синтезируемый плазмидой pTNFba, состоял из N-концевой части лимфотоксина (участок 22–125), соединенной с последовательностью 126–157 hTNF- α . Полученные белки схематически представлены на рис. 2.

Плазмиды pTNF90, pTNFab и pTNFba после трансформации ими клеток *E. coli* SG20050 обеспечивали высокий уровень биосинтеза мутантного и гибридных белков TNF90, TNFab и TNFba. Лизаты ночных культур разделяли в денатурирующем ПААГ и после переноса на нитроцеллюлозную мембрану проводили иммунодетекцию с Mab E7H2 (рис. 3). Оказалось, что укороченный мутант TNF90 и гибрид TNFab связываются с Mab E7H2 (рис. 3б, б и 4), тогда как TNFba не взаимодействует с этими антителами (рис. 3б, 5). Это позволило сделать вывод, что антигенная детерминанта находится в районе 28–125 hTNF- α .

Для точной локализации сайта взаимодействия hTNF- α с антителами мы сконструировали ряд плазмид, кодирующих химерные белки hTNF- α с mTNF- α . Поскольку мышинный TNF- α имеет высокую степень гомологии с человеческим, мы предварительно убедились с помощью Вестерн-блот-анализа, что mTNF- α не взаимодействует с Mab E7H2. При конструировании гибридных генов использовали плазмиды pTNF331 и pmTNF (рис. 1), содержащие соответственно структурные гены hTNF- α и mTNF- α под контролем промоторов A₂ и A₃ ранней области бактериофага T7 и промотора триптофанового оперона *E. coli*. При этом мы приняли во внимание наличие об-

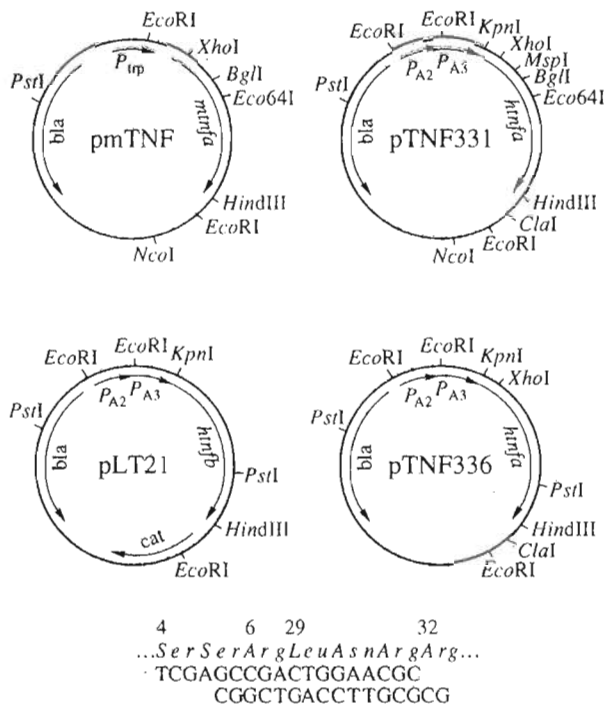


Рис. 1. Схемы плазмид для конструирования и экспрессии химерных генов; *hinfA*, *hinfB* и *mtnfA* – гены hTNF- α , hTNF- β и mTNF- α соответственно; P_{A2} и P_{A3} – промоторы из ранней области бактериофага T7; P_{trp} – триптофановый промотор *E. coli*. Внизу приведена структура синтетического дуплекса, использованного при получении плазмиды pTNF90, и кодируемая им аминокислотная последовательность; указаны номера аминокислотных остатков по последовательности зрелого hTNF- α [5].

щих для генов *hinfA* и *mtnfA* сайтов рестрикции *BglII* и *Eco64I*. Рекомбинацией по этим сайтам были получены следующие плазмиды: pmhTNF336, кодирующая область 1–36 мышинного TNF- α и фрагмент 37–157 человеческого TNF- α ; phmTNF36, химерный ген которой кодирует область 3–36 hTNF- α и 37–156 mTNF- α ; pmhTNF49, кодирующая гибрид 49 N-концевых аминокислот мышинного TNF- α с аминокислотами 50–157 hTNF- α ; p Δ hTNF, кодирующая область 37–49 hTNF- α в обрамлении аминокислотных остатков 1–36 и 50–156 мышинного белка (рис. 2). В зависимости от последовательностей, предшествующих 5'-концевой области химерных генов, экспрессия этих генов находилась под контролем тандема промоторов A₂ и A₃ (плазмиды phmTNF36) или триптофанового промотора *E. coli* (плазмиды pmhTNF36, pmhTNF49, p Δ hTNF).

Природные и химерные TNF были выделены и очищены в соответствии с ранее описанной методикой [16]. Интересно, что практически все гибриды мышь-человек накапливались в цитоплазме *E. coli* как хорошо растворимые белки, за исключением слабо растворимого белка pmhTNF49.

Их биологическая активность в стандартном тесте на линии мышинных фибробластов L929 [17] была сопоставима с активностью природного фактора некроза опухолей, при этом химерный белок hmTNF36 неожиданно проявил более высокую активность, чем сам mTNF- α (таблица).

Взаимодействие полученных химерных белков с Mab E7H2 изучали как на выделенных препаратах (рис. 4), так и в лизатах ночных культур *E. coli*, содержащих эти белки (рис. 3). В качестве положительного и отрицательного контроля использовали hTNF- α и mTNF- α . При этом было установлено, что N-концевые аминокислотные остатки вплоть до 36-го не принимают участия в связывании (рис. 3, 9; рис. 4, 6). С другой стороны,

37

49

hTNF- α Ala-Asn-Gly-Val-Glu-Leu-Arg-Asp-Asn-Gln-Leu-Val-Val...mTNF- α Ala-Asn-Gly-Met-Asp-Leu-Lys-Asp-Asn-Gln-Leu-Val-Val...

Мы предполагаем, что именно эти аминокислотные остатки вносят основной вклад в процесс узнавания hTNF- α антителами E7H2. Дальнейшее уточнение роли каждого из этих аминокислотных остатков во взаимодействии с Mab E7H2 может быть сделано после их замен с помощью сайт-направленного мутагенеза. Интересно, что Mab E7H2 взаимодействуют с химерным белком mhTNF36 несколько слабее, чем с природным белком hTNF- α или его делеционным вариантом TNF90. Вероятно, в пределах участка 29–36 есть аминокислотные остатки, не обязательные для связыва-

ния с иммуноглобулинами, но облегчающие формирование комплекса антиген–антитело.

Локализованная нами антигенная детерминанта расположена на внешней поверхности молекулы тримера TNF- α внутри короткой β -складки, которая не принимает участия во взаимодействии по крайней мере с одним из TNF-рецепторов, TNFR55, как было недавно показано рентгеноструктурным анализом комплекса растворимого фрагмента рецептора TNFR55 с лимфотоксином человека (hTNF- β) [19]. Этим объясняется сохранение биологической активности hTNF- α при его взаимодействии с Mab E7H2 [10].

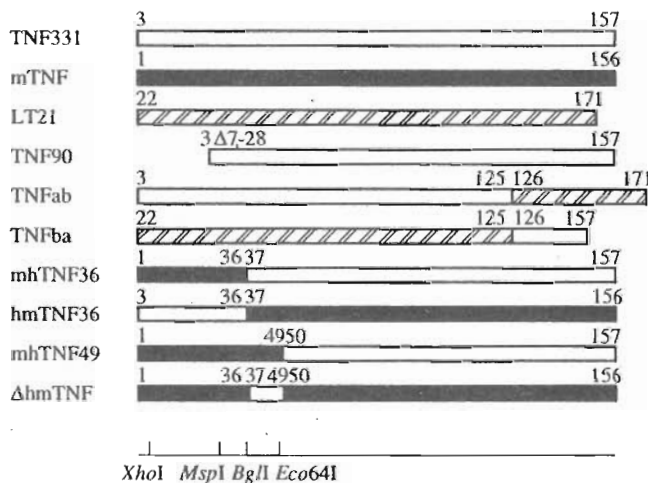


Рис. 2. Схематическое изображение мутантных и гибридных белков. Светлые и темные полосы – аминокислотные последовательности hTNF- α и mTNF- α соответственно; заштрихованные сегменты – аминокислотные последовательности hTNF- β . Цифрами указана нумерация аминокислотных остатков соответствующих белков. Внизу указано расположение рестриктных сайтов на структурном гене *htnfa* (*mtnfa*), использованных для получения гибридов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы фирм Merck и Serva (Германия), эндонуклеазы рестрикции и ДНК-лигазу фага T4 производства “Фермент” (Вильнюс), набор для определения первичной структуры ДНК (USB, США), конъюгат пероксидазы хрена с иммуноглобулинами кролика (Sigma, США).

Бактериальные штаммы: *E. coli* XL-1 Blue (*rec A1*, *end A1*, *gyr A96*, *thi 1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA*, $\Delta(lac-proAB)$, F' *proAB*, *lacI^q*, *lacZΔM15*, *Tn10* (Stratagene); *E. coli* SG20050 *recA* (F⁻, *araD139*, $\Delta(argF-lac)U169$, *flb B5301*, *deoC1*, *rpsL150*, *relA1*, $\Delta lon-100$, *csp-50::Mu dI*) [20].

Приготовление питательных сред, выращивание бактерий, выделение плазмидных ДНК, рестриктный анализ и электрофорез проводили по стандартным методикам [21], приготовление компетентных клеток и трансформацию бактерий – по методике [22].

Конструирование плазмид. В качестве исходных использовались плазмиды pTNF331, pTNF336,

Цитотоксическая активность* химерных TNF- α

Химерные белки	Цитотоксическая активность**, 10 ⁷ ед./мг	Относительная активность
hTNF- α (дикий тип)	1.8	1
mTNF- α (дикий тип)	59	33
mhTNF36	3.8	2.1
hmTNF36	110	61
Δ hmTNF	7.2	4

* Активность определяли как описано в работе [17].

** Приведены результаты трех измерений.

pLT21 [13–15] и плазида рmTNF, содержащая ген мышиноного TNF- α под контролем триптофанового промотора, любезно предоставленная В.В. Кравченко (ГНЦ вирусологии и биотехнологии “Вектор”) и С.А. Недоспасовым (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта).

Для получения плазмиды рTNF90 плазмидную ДНК рTNF331 расщепляли *MspI* и *HindIII*, фрагмент длиной 504 п. о., содержащий структурный ген hTNF- α , лишенный 32 N-концевых кодонов, очищали электрофорезом в 8% ПААГ и затем лигировали с *HindIII-XhoI*-фрагментом (3.2 т. п. о.) из рTNF331 в присутствии избытка синтетического *XhoI-MspI*-дуплекса (рис. 16). Скрининг рекомбинантных клонов проводили гибридизацией с 5'-³²P-мечеными олигонуклеотидами клонируемого дуплекса. В результате получили плазмиду рTNF90, кодирующую hTNF- α с делецией фрагмента 7–28.

Плазмиду рTNF α b получали лигированием фрагмента *HindIII-KpnI* (3.2 т. п. о.) из рTNF331 с фрагментами *KpnI-PstI* (402 п. о.) из рTNF336 и *PstI-HindIII* (342 п. о.) из рLT21. Аналогичным образом лигированием *HindIII-KpnI*- и *KpnI-PstI*-фрагментов из рLT21 с *PstI-HindIII*-фрагментом из рTNF336 получили плазмиду рTNF α b.

Для конструирования плазмид, кодирующих химерные белки hTNF- α -mTNF- α , использовали наличие общих для этих генов сайтов рестрикции *BglI* и *Eco64I*. Плазмиду рmhTNF36 конструировали лигированием фрагмента *PstI-BglI* (1072 п. о.) из рmTNF с фрагментами *BglI-HindIII* (492 п. о.) и *HindIII-PstI* (2840 п. о.) плазмиды рTNF331. Плазмиду рmhTNF49 получили в результате лигирования *PstI-Eco64I*-фрагмента длиной 1111 п. о. из плазмиды рmTNF с фрагментами *Eco64I-NcoI* (736 п. о.) и *NcoI-PstI* (1848 п. о.) из рTNF331. Рекомбинант рhmTNF36 образовали встраиванием

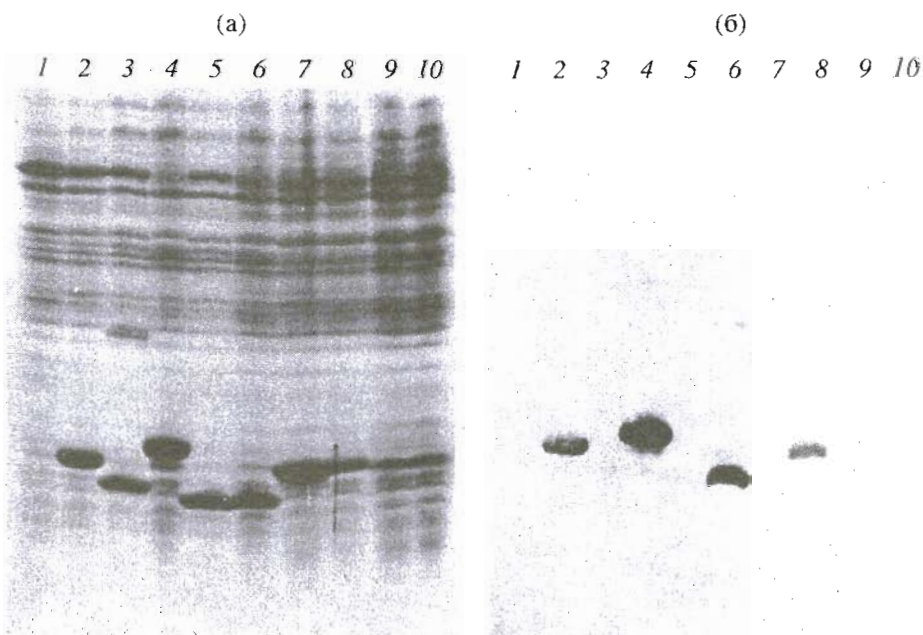


Рис. 3. Электрофорез в 13% SDS-ПААГ (а) и иммуноблоттинг с Mab E7H2 (б) лизата ночных культур *E. coli* 3G20050 без плазмиды (контроль) (1) и трансформированных плазмидами рTNF331 (2), рLT21 (3), рTNF α b (4), рTNF α b (5), рTNF90 (6), рmTNF (7), рmhTNF36 (8), рhmTNF36 (9), рmhTNF49 (10).

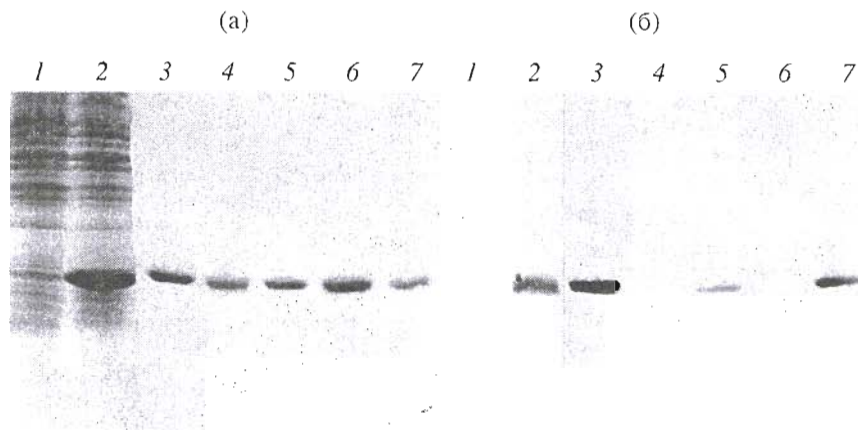


Рис. 4. Электрофорез в 13% SDS-ПААГ (а) и иммуноблоттинг (б) клеточного лизата ночных культур *E. coli* SG20050 и выделенных белков: 1 – *E. coli* SG20050 без плазмиды (контроль); 2 – *E. coli* (рΔhmTNF); 3 – hTNF-α; 4 – mTNF-α; 5 – mhTNF36; 6 – hmTNF36; 7 – ΔhmTNF.

соответствующего *PstI*-*BglII*-фрагмента рTNF331 в рmTNF, используя многокомпонентное лигирование, как описано выше для рmhTNF36. Гибридная плазида рΔhmTNF, содержащая в структурном гене *tnfa* замену фрагмента *BglII*-*Eco64I* на соответствующий фрагмент из гена *htnfa*, была получена в результате соединения фрагментов *PstI*-*Eco64I* (1107 п. о.) плазмиды рmhTNF36, *Eco64I*-*NcoI* (871 п. о.) плазмиды рmTNF и векторного фрагмента *NcoI*-*PstI* из рTNF331.

Химерные белки mhTNF36, hmTNF36, ΔhmTNF, а также человеческий и мышиный TNF-α выделяли как описано ранее [16]. Электрофорез белков в ПААГ проводили по методу Лэммли [23], концентрацию очищенных препаратов определяли, используя Protein assay kit (Bio-Rad, США).

Моноклональные антитела выделяли из асцитной жидкости или супернатанта гибридом с помощью аффинной хроматографии на антиген-сефарозе. Для этого рекомбинантный человеческий hTNF-α иммобилизовали на CNBr-активированной сефарозе CL-4B (Pharmacia) по стандартной методике [24]. Асцитную жидкость или супернатант разбавляли в соотношении 1 : 10 фосфатным буфером (50 мМ Na-фосфат, pH 7.4, 0.5 М NaCl) и наносили на колонку с аффинным сорбентом, уравновешенную этим же буфером. Антитела элюировали глициновым буфером, pH 2.8. Фракции, содержащие Mab E7H2, немедленно нейтрализовали 1 М трис (pH 11), диализовали против фосфатного буфера и аликвоты хранили при -20°C .

Имуноблоттинг с Mab E7H2 проводили как описано в работе [25]. Перенос белков на нитроцеллюлозный фильтр осуществляли в приборе для полусухого переноса (BioTecMed) в течение 1 ч при 0.8 мА/см². Неспецифическую сорбцию белков предотвращали инкубацией мембраны в бу-

фере TBS (10 мМ трис-HCl, pH 8.0, 150 мМ NaCl), содержащем 1% BSA, в течение 1 ч при 20°C . Затем мембрану инкубировали 2.5 ч в TBS, 1% BSA, содержащем Mab E7H2 (1 : 1000), промывали 0.1% Tween-20 в TBS и выдерживали 1.5 ч с конъюгатом пероксидазы хрена и иммуноглобулинов кролика против мыши в TBS. Полосы визуализировали обработкой 4-хлорнафтолом в TBS, содержащем 20% метанол и 0.03% H₂O₂.

Авторы выражают благодарность В.В. Кравченко (Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор", Кольцово Новосибирской обл.), а также С.А. Недоспасову (ИМБ РАН) за плазмиду рmTNF и Д.С. Есипову (ИБХ РАН) за синтетические олигонуклеотиды.

Работа финансировалась грантами Международного научного фонда NF7000 и NF7300.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Garotta G., Ozmen L., Fountoulakis M., Dembic Z., van Loon A.P.G.M., Stueber D. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 6908–6915.
2. Burnens A., Demetz S., Corradin G., Binz H., Bosshard H.R. // Science. 1987. V. 235. P. 780–783.
3. Jemmerson R., Paterson Y. // Science. 1986. V. 232. P. 1001–1004.
4. Jemmerson R., Paterson Y. // BioTechniques. 1986. V. 4. P. 18–31.
5. Pennica D., Nedwin G., Hayflick J., Seeburg P., Derynck R., Palladino M., Kohr W., Aggarwal B.B., Goeddel D.E. // Nature. 1984. V. 321. P. 724–729.
6. Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.L., Green S., Fiore N., Williamson B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1975. V. 72. P. 3666–3670.
7. Fiers W. // The Natural Immune System: Humoral Factors / Ed. S. Sim. Oxford: IRL Press, 1993. P. 65–119.

8. *Bevilacqua M.P., Pober J.S., Majeau G.R., Fiers W., Cotran R.S., Gimbrone M.A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 4533–4537.
9. *Taguchi H., Sohmura Y.* // Biotherapy. 1991. V. 3. P. 177–186.
10. *Беркова Н.П.* Получение и изучение свойств моноклональных антител к фактору некроза опухолей человека. Дис. канд. биол. наук. М.: ИБХ РАН, 1990. С. 79–101.
11. *Berkova N., Karawajew L., Korobko V., Berhsing O., Micheel B., Shamborant O., Stukacheva L., Shingarova L.* // Biotechnol. Appl. Biochem. 1996. V. 23. P. 163–171.
12. *Vandenabeele P., Declercq W., Beyaert R., Fiers W.* // Trends. Cell Biol. 1995. V. 5. P. 392–399.
13. *Коробко В.Г., Добрынин В.Н., Филиппов С.А., Шингарова Л.Н., Чувпило С.А., Болдырева Е.Ф., Кравченко В.В., Недоспасов С.А., Шахов А.И., Турецкая Р.Л.* Рос. пат. 1986. № 1438240.
14. *Kircheis R., Milleck J., Korobko V.G., Shingarova L.N., Behnke D., Schmidt H.E.* // Immunology. 1992. V. 76. P. 433–438.
15. *Коробко В.Г., Давыдов И.В., Добрынин В.Н., Пустошилова Н.М., Лебедев Л.П., Гилева И.П., Петренко В.А.* // Биооргани. химия. 1993. Т. 19. С. 414–419.
16. *Шингарова Л.Н., Сагайдак Л.Н., Турецкая Р.Л., Недоспасов С.А., Есинов Д.С., Коробко В.Г.* // Биооргани. химия. 1996. Т. 22. С. 243–251.
17. *Kramer S.M., Carwer M.E.* // Immunol. Meth. 1986. V. 93. P. 201.
18. *Pennica D., Hayflick J., Bringman T.S., Palladino M., Goedel D.E.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 6060–6064.
19. *Banner D.W., D'Arcy A., Janes W., Gentz R., Schoenfeld H.-J., Broger C., Loetscher H., Lesslauer W.* // Cell. 1993. V. 73. P. 431–445.
20. *Trisler P., Gottesman S.* // J. Bacteriol. 1984. V. 160. P. 184–191.
21. *Маниатис Е., Фрич Е.Е., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование: Пер. с англ. М.: Мир, 1984.
22. *Клонирование ДНК. Методы / Ред. Д. Гловер.* Пер. с англ. М.: Мир, 1988. Т. 1. С. 159.
23. *Laemmli U.K.* // Nature. 1979. V. 227. P. 680–685.
24. *Tan-Wilson A.L., Rechlin M., Noble R.W.* // Immunochimistry. 1976. V. 13. P. 921–927.
25. *Towbin H., Strahelin T., Gordon J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 4350–4354.

Interaction of Anti-TNF- α Monoclonal Antibodies E7H2 with Mutant and Hybrid Proteins

L. N. Shingarova, L. N. Sagaidak, N. P. Berkova, and V. G. Korobko

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

Received November 27, 1996

Abstract—A number of hybrid proteins containing amino acid sequences of human lymphotoxin and human and mouse tumor necrosis factors were obtained by means of genetic engineering. By using these proteins, an antigenic determinant in the molecule of human tumor necrosis factor for monoclonal antibodies E7H2 (MAb E7H2), previously developed against this factor was localized. It was demonstrated by Western blot analysis that the MAb E7H2-binding site is located in the sequence region 37–49 of human tumor necrosis factor and includes the sequence Val⁴¹GluLeuArg⁴⁴ directly interacting with MAb E7H2.

Key words: tumor necrosis factor (hTNF- α), lymphotoxin (hTNF- β), hybrid proteins, expression in *E. coli*, monoclonal antibodies.