



УДК 577.218

## ИСКУССТВЕННЫЙ ГЕН, БИОСИНТЕЗ И СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО Fc-ФРАГМЕНТА ИММУНОГЛОБУЛИНА G1 ЧЕЛОВЕКА

© 1996 г. В. А. Ефимов<sup>#</sup>, А. Л. Калинин, А. Ф. Фрадков, О. Г. ЧахмахчеваИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 18.07.95 г.

Осуществлены химико-ферментативный синтез и клонирование гена, кодирующего Fc-домен иммуноглобулина G1 человека. Искусственный ген экспрессирован в клетках *E. coli* в составе плазмидных векторов под контролем позднего промотора фага T7. Показано, что выделенный из бактериальных клеток рекомбинантный белок способен давать димерную форму и связывать белок А из *Staphylococcus aureus*.

*Ключевые слова:* химико-ферментативный синтез, искусственный ген, Fc-фрагмент иммуноглобулина G1 человека, экспрессия в *E. coli*.

В последние годы развитие методов генетической инженерии сделало доступным множество белков различной природы, применение которых для терапии, диагностики и в исследовательских целях сдерживалось трудностью их получения из природных источников и гетерогенностью популяций молекул. Одним из характерных примеров такого рода являются работы по микробиологическому синтезу искусственных антител или подобных им молекул [1]. Химерные антитела могут применяться, в частности, в терапии рака и множественного склероза, их также можно использовать для иммунной супрессии во время трансплантации органов. Кроме того, генно-инженерная технология получения химерных антител может быть полезна в выяснении структурно-функциональных особенностей белков.

Клонирование последовательностей ДНК, кодирующих молекулы иммуноглобулинов или их фрагменты, позволило в ряде случаев создать альтернативу гибридомной технологии или извлечению антител из плазмы крови. Стало возможным получать новые белки-антитела с помощью комбинирования фрагментов генов различных антител, создавая таким образом по желанию исследователя новые молекулы. Более того, генно-инженерный подход позволяет получать гомогенный пул молекул антител, обладающих специфическими, заранее заданными свойствами, а также меньшей иммуногенностью, что весьма важно при диагностике и терапии в применении к

человеку [2]. Однако, несмотря на интенсивное использование этого подхода, далеко не все возможные здесь направления получили свое развитие. Известные из литературы работы по созданию искусственных антител, как правило, касаются клонирования и экспрессии в различных системах генов, кодирующих фрагменты антигенсвязывающих участков антител (вариабельные Fab-домены) в тех или иных комбинациях [3, 4]. В то же время представляет несомненный интерес разработка источника получения константного Fc-домена, обеспечивающего связывание с комплементом и фагоцитарными клетками. Обычно Fc-домен получают путем обработки гетерогенной популяции иммуноглобулинов папаином с отщеплением Fab-фрагмента [5]. Константная часть молекул антител находит широкое применение при получении конъюгатов с другими белками, в производстве аффинных сорбентов. Кроме того, известно, что присоединение Fc-фрагмента к белкам, не являющимся антителами, значительно повышает устойчивость последних в кровотоке, удлиняя тем самым время полужизни препаратов [6].

Настоящее сообщение посвящено синтезу искусственного гена Fc-фрагмента IgG1 человека, его экспрессии в бактериальных клетках и изучению свойств полученного таким образом рекомбинантного белка.

Для синтеза и клонирования целевого гена была выбрана нуклеотидная последовательность, кодирующая шарнирную область и константную часть тяжелой цепи IgG1 человека (C<sub>H</sub>2 и C<sub>H</sub>3-домены) [7], в которую были внесены минимальные изменения (рис. 1). В частности, в последовательность

Сокращения: IPTG – изопропил-β-D-тиогактопиранозид, PMSF – фенилметилсульфонилфторид, BSA – бычий сывороточный альбумин.

<sup>#</sup> Автор для переписки.

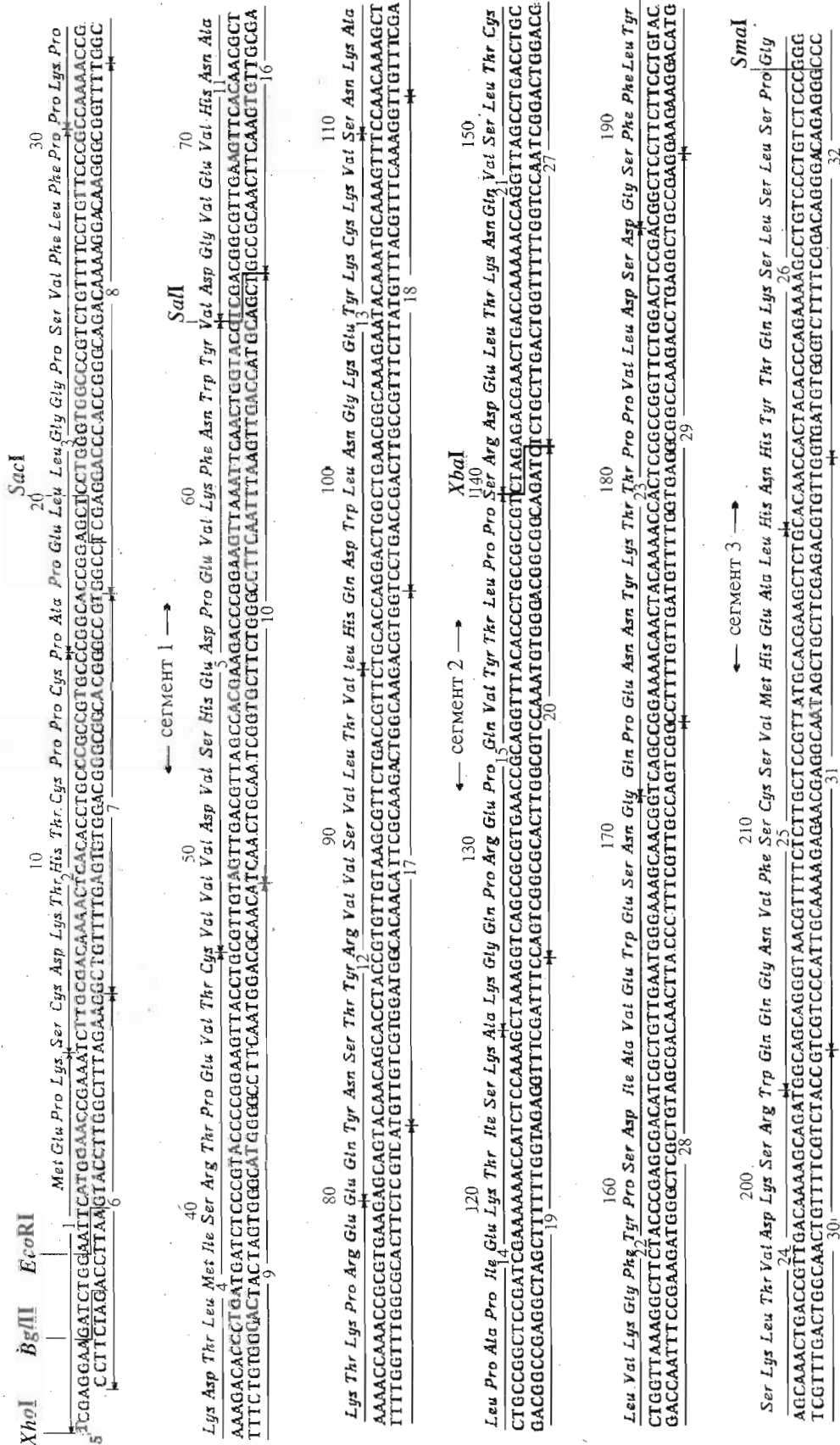


Рис. 1. Последовательность синтетического гена и аминокислотная последовательность Fc-домена IgG человека. Горизонтальными стрелками показаны использованные при конструировании гена олигонуклеотиды, а вертикальными – границы сегментов 1–3, из которых собирался ген.

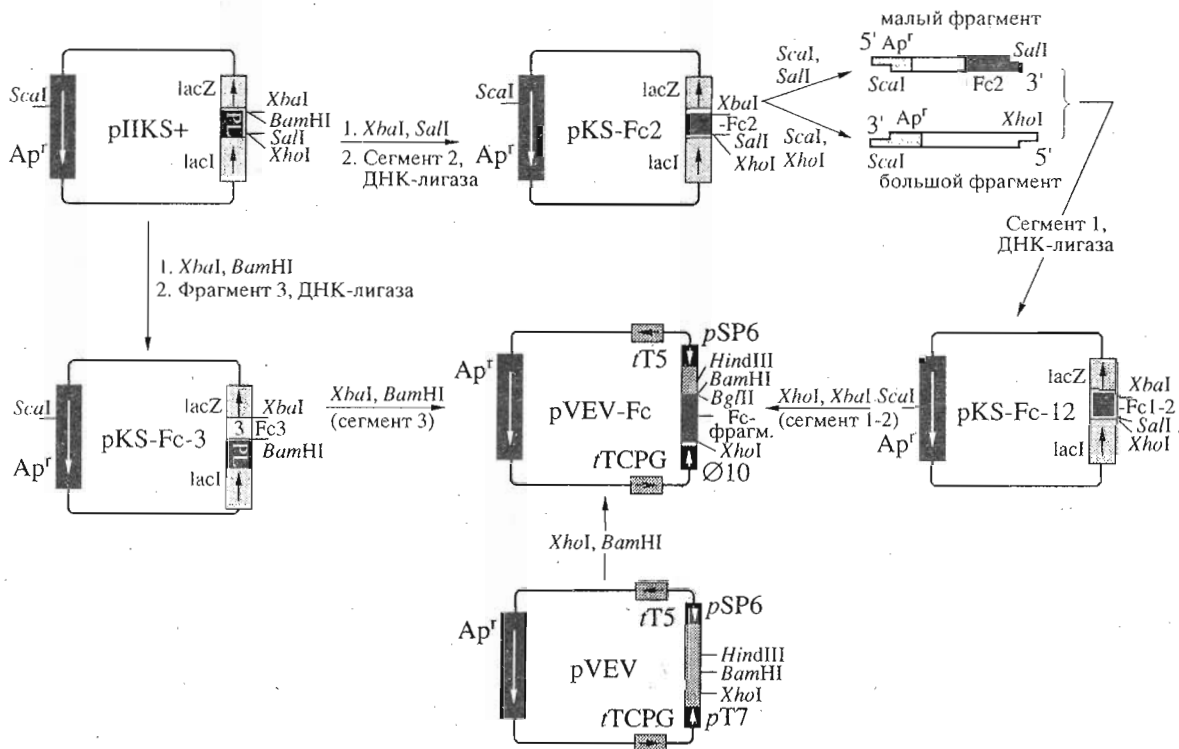


Рис. 2. Схема клонирования сегментов и сборки синтетического гена, кодирующего Fc-домен IgG человека. PL – полилинкерный участок (показаны сайты эндонуклеаз рестрикции, необходимые для клонирования целевого гена); *tT5* – терминатор ранних генов D10–D15 фага T5; *tTCPG* – терминатор гена кристаллического белка из *B. thuringiensis*; *pSP6* – промоторная область фага SP6;  $\emptyset 10$  – промотор гена 10 фага T7.

синтетического гена путем незначительных замен был введен ряд внутренних сайтов узнавания эндонуклеазами рестрикции, разделивших его на три части (сегменты 1–3, рис. 1), которые клонировали по отдельности, а затем соединяли между собой в экспрессирующем векторе. Кроме того, на обоих концах гена были введены небольшие полилинкеры, содержащие сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции, что дает возможность при необходимости легко переносить ген из одного вектора в другой и подстраивать к нему гены других полипептидов. Синтез 32 олигонуклеотидов, из которых был составлен ген длиной около 750 п. о., проводился в автоматическом режиме фосфитамидным методом [8]. Полученные олигонуклеотиды после удаления защитных групп и очистки 5'-фосфорилировали с помощью полинуклеотидкиназы фага T4 в присутствии АТР и соединяли с помощью ДНК-лигазы фага T4 с образованием трех дуплексов с «липкими» концами, соответствующих сегментам 1–3, которые после выделения гель-электрофорезом клонировали по отдельности в коммерчески доступном фагидном векторе pBlueScript ИКС+/- (далее pIKS), содержащем в полилинкере подходящий набор сайтов узнавания рестриктазами.

Так, сегмент 2 был клонирован между *XbaI*- и *Sall*-сайтами этого вектора. Полученную при

этом конструкцию pKS-Fc2 использовали в качестве вектора для клонирования сегмента 1 по *XhoI*-*Sall*-сайтам (рис. 2). Отбор клонов, несущих вставку в правильной ориентации, проводили по результатам рестриктного анализа рекомбинантных плазмид. Целевая конструкция получила наименование pKS-Fc12. Сегмент 3 (*XbaI*-*BamHI*) клонировали аналогично по соответствующим сайтам вектора pIKS с получением плазмиды pKS-Fc3 (рис. 2).

Окончательную сборку последовательности целевого гена проводили в полученном нами ранее плазмидном векторе pVEV [9]. С этой целью плазмиду pVEV обработали рестриктазами *XhoI* и *BamHI* и лигировали с выщепленными из векторов pKS-Fc-12 и pKS-Fc-3 сегментами 1–2 (фрагмент *XhoI*-*XbaI*) и сегментом 3 (фрагмент *XbaI*-*BamHI*) одновременно (см. рис. 3). После селекции рекомбинантных ДНК была отобрана целевая плазмида pVEV-Fc, несущая ген мономерного Fc-домена, нуклеотидную последовательность которого подтвердили секвенированием по методу Сенгера.

Для осуществления экспрессии целевого гена последний выщепляли из плазмиды pVEV-Fc обработкой эндонуклеазами *BglII* и *HindIII* и вводили вместе с небольшим синтетическим дуплексом (I), необходимым для сохранения рамки считывания

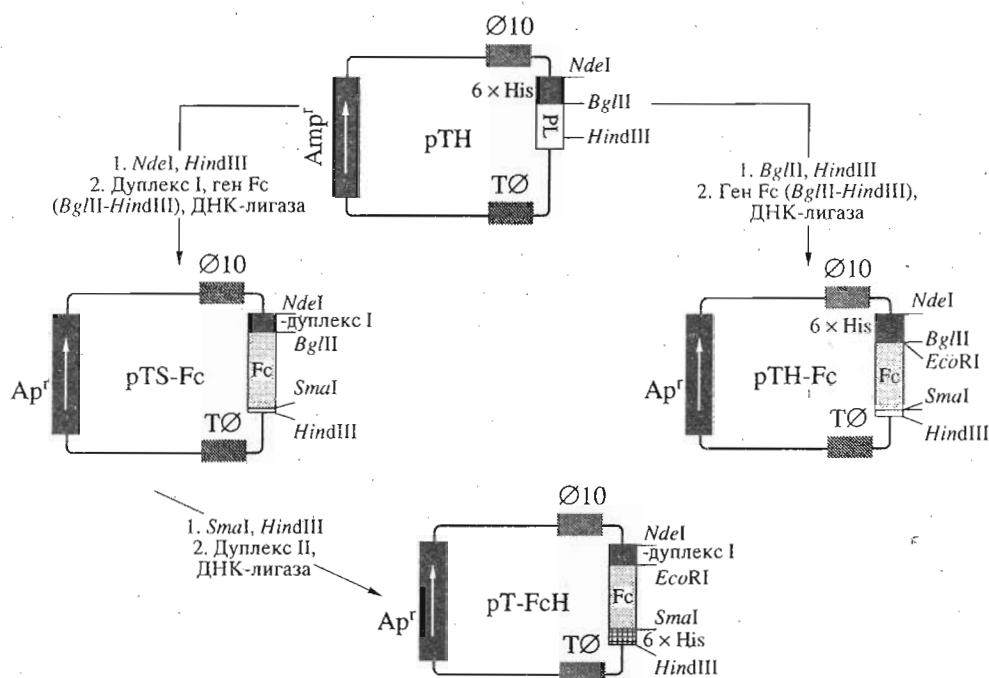
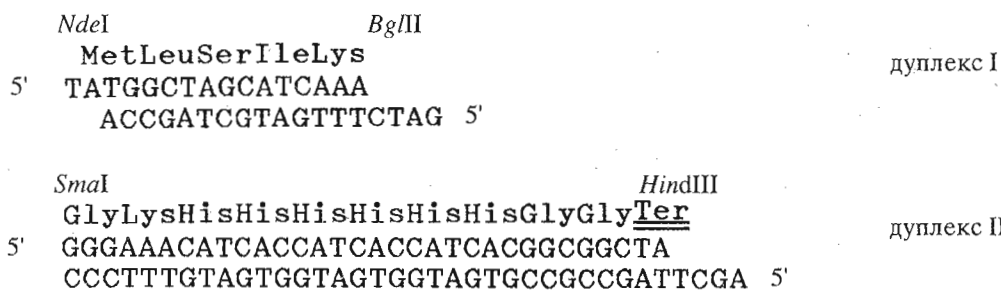


Рис. 3. Схема конструирования экспрессирующих векторов pTS-Fc, pTH-Fc и pT-FcH. Ø10 – промотор гена 10 фага T7; TØ – терминатор гена 10 фага T7; 6 × His – фрагмент ДНК, кодирующий гексагистиридиновый пептид.

гена Fc-фрагмента, в плазмиду pTH [10], предварительно расщепленную эндонуклеазами *NdeI* и *HindIII* (рис. 3). При этом продукт экспрессии гена в составе рекомбинантной плазмиды pTS-Fc должен содержать на N-конце четыре дополнитель-

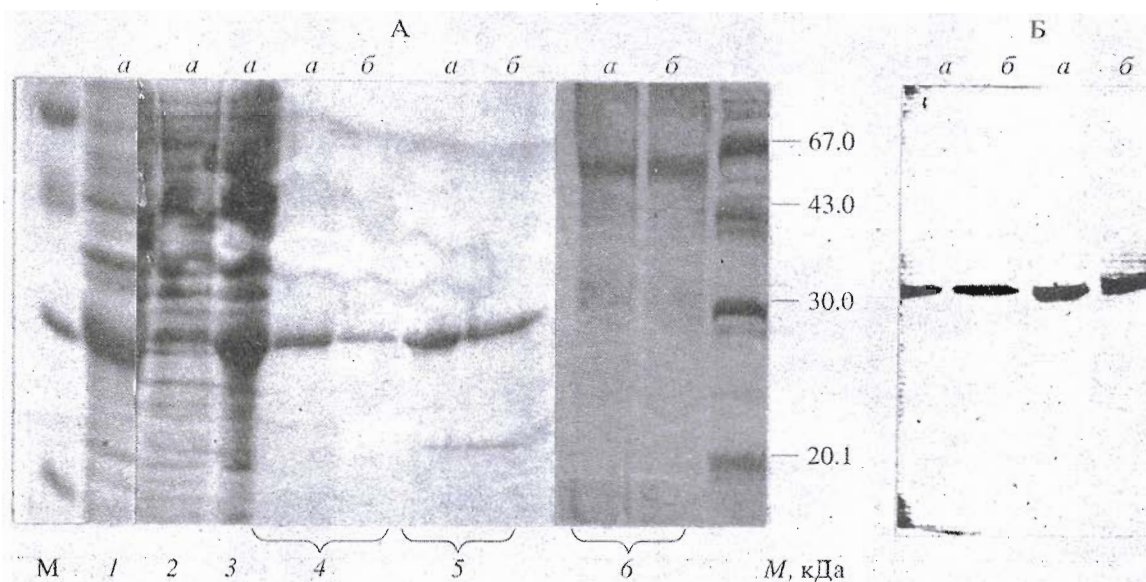
ных аминокислотных остатка. Во втором случае ген вводили в вектор pTH между *BglII*–*HindIII*-сайтами, что привело к плазмиде pTH-Fc, в которой целевому гену предшествует фрагмент ДНК, кодирующий гексагистиридиновый пептид (рис. 3).



В третьей конструкции, pT-FcH, полученной путем введения дуплекса II в плазмиду pTS-Fc по сайтам рестриктаз *SmaI*–*HindIII*, за целевым геном следуют шесть гистиридиновых (6 × His) и терминирующий (Ter) кодоны.

Полученными таким образом плазмидными ДНК pVEV-Fc, pTS-Fc, pTH-Fc и pT-FcH были трансформированы клетки *E. coli* BL21(DE3). Трансформанты высевались на чашки со средой LB, содержащей ампициллин и IPTG. Колонии, продуцирующие Fc-фрагмент, выявляли блоттингом с конъюгатом белка А и пероксидазы. Белковые продукты отдельных отобранных клонов анализировали электрофорезом в ПААГ в присутствии SDS. В случае штамма *E. coli*

BL21(DE3)/pVEV-Fc нам не удалось обнаружить продукт экспрессии гена Fc-домена. В то же время было показано, что содержание рекомбинантного белка во всех остальных штаммах было примерно одинаковым и достигало 25–30% от суммарного количества белка в клетке, причем до 70% Fc-фрагмента было обнаружено в виде нерастворимых тел включения и находилось в дебрисе, а 30% оставалось в цитоплазме в растворимой форме (рис. 4). Рекомбинантный Fc-фрагмент синтезировался в клетках штаммов-продуцентов в виде мономера с молекулярной массой ~27–28 кДа. Белковый продукт идентифицировали иммуноферментным анализом с кроличьими антителами против IgG человека.



**Рис. 4.** Анализ белковых фракций, выделенных из клеток штаммов *E. coli* BL21(DE3), несущих экспрессирующие плазмиды рТН-Fc (а) и рТ-FcH (б). А – электрофорез в 10% ПААГ с SDS. М – маркеры молекулярной массы. 1 – суммарный клеточный лизат; 2 – растворимая цитоплазматическая белковая фракция; 3 – нерастворимая белковая фракция (дебрис); 4 – рекомбинантный белок после очистки хроматографией на Ni-агарозе; 5 – рекомбинантный Fc-фрагмент после хроматографии на белок-А-сефарозе (электрофорез в присутствии 2-меркаптоэтанола); 6 – рекомбинантный Fc-фрагмент после хроматографии на белок-А-сефарозе (электрофорез в отсутствие 2-меркаптоэтанола). Б – результаты иммуноблоттинга белковых фракций 4 и 5 с использованием антител к Fc-фрагменту.

Более богатую рекомбинантным белком нерастворимую фракцию использовали в экспериментах по выделению и ренатурации целевого продукта. Выделение денатурированного Fc-фрагмента из штамма *E. coli* BL21(DE3)/pTS-Fc осуществляли промывкой клеточного дебриса детергентом с последующим растворением белка в гуанидингидрохлориде. Ренатурацию и димеризацию белка проводили диализом, подобно тому как это было описано нами ранее для ренатурации рекомбинантного белка D1 фотосистемы II ячменя [11]. В случае же Fc-фрагмента, содержащего на N- или C-конце остатки гистидина, очистку и ренатурацию рекомбинантного белка проводили на колонке с Ni<sup>2+</sup>-NTA-агарозой [10]. Электрофоретический анализ ренатурированного рекомбинантного белка в отсутствие 2-меркаптоэтанола показал, что значительное количество полученного продукта было представлено в виде димера (рис. 4).

Для подтверждения образования рекомбинантным белком структуры, сходной с нативной структурой Fc-домена, было также использовано свойство селективного взаимодействия IgG с IgG-связывающим фрагментом белка А из *Staphylococcus aureus*. С этой целью раствор рекомбинантного белка непосредственно после выделения и ренатурации наносили на колонку с сефарозой, на которой был иммобилизован белок А. Элюцию связавшегося с сорбентом белка прово-

дили 0.2 М раствором уксусной кислоты. Белковые фракции анализировали электрофорезом в SDS-ПААГ (рис. 4А) и иммуноблоттингом, как описано выше. Было показано, что все гибридные белки – продукты экспрессии гена Fc-домена в рекомбинантных векторах (рTS-Fc, рТН-Fc и рТ-FcH) – одинаково хорошо взаимодействуют с аффинным сорбентом и были практически неотличимы по свойствам в проведенных экспериментах. Таким образом, рекомбинантный продукт проявил высокое сродство к IgG-связывающему фрагменту белка А *S. aureus*, что характерно для природных антител.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали эндонуклеазы рестрикции, ДНК-лигазу фага Т4, полинуклеотидкиназу фага Т4 и ДНК-полимеразу I *E. coli* (фрагмент Кленова) (Pharmacia, Швеция), Ni(II)-NTA-агарозу (Diagen, ФРГ), белок-А-сефарозу (Sigma, США), фазмидный вектор pBlueScript PKS+ (Stratagene, США). Ферментативные реакции проводили как описано ранее [12, 13]. Химический синтез олигонуклеотидов осуществляли фосфитамидным методом [8] на синтезаторе 381A (Applied Biosystems, США). Конструирование рекомбинантных плазмид и трансформацию компетентных клеток *E. coli*, а также скрининг колоний

гибридизацией с мечеными синтетическими олигонуклеотидами, выделение плазмид и секвенирование фрагментов ДНК осуществляли по методикам, описанным в работах [14, 15]. Электрофорез белков в ПААГ с SDS, прокрашивание белковых зон кумасси R-250 и иммуноблоттинг проводили как описано в работе [16]. При электрофорезе белков в присутствии SDS в невосстанавливающих условиях из буфера для образцов исключали 2-меркаптоэтанол [6]. Количество целевого белка в клетках *E. coli* оценивали сканированием пластин ПААГ, покрашенных кумасси, на приборе Ultrosan (ЛКВ, Швеция).

Иммуноферментный анализ на наличие рекомбинантного Fc-фрагмента и иммуноблоттинг проводили с использованием кроличьих антител к IgG человека (Dakoratts, Дания). Клоны *E. coli* штамма BL21(DE3), продуцирующие Fc-фрагмент, отбирали дот-блоттингом с использованием конъюгата белка А с пероксидазой хрена. Нитроцеллюлозную мембрану (BA-85, Schleicher und Schüll, ФРГ) с лизированными колониями инкубировали 2 ч в 3% растворе BSA в PBS-буфере (370 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 7.7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2) с добавлением 0.05% Tween-20, далее помещали мембрану в 1.5% раствор BSA в том же буфере и добавляли конъюгат белка А с пероксидазой хрена (разведение 1 : 1000), продолжали инкубацию последующие 2 ч. Окрашивание нитроцеллюлозного фильтра осуществляли *o*-фенилендиамином.

Биомассу клеток *E. coli* BL21(DE3), содержащих экспрессирующие векторы, растили на среде LB с 50 мкг/мл ампициллина при 37°C в течение нескольких часов до достижения величины поглощения 0.6 при 600 нм. Затем прибавляли индуктор *lac*-оперона IPTG до концентрации 1 mM и продолжали инкубацию еще 3–16 ч. Клетки осадили центрифугированием (5000 об/мин, 15 мин), замораживали при –70°C и разрушали в течение 2–3 мин ультразвуком (дезинтегратор Braun Sonic 1510, В. Braun Melsungen AG, ФРГ) при 0°C в буфере, содержащем 0.05 M EDTA, 0.1 M трис-HCl (pH 7.9), 0.2 M NaCl, 10 mM 2-меркаптоэтанол и 20 мкг/мл PMSF, после чего клеточный дебрис отделяли от цитоплазматической фракции центрифугированием (12000 об/мин, 20 мин). Дебрис промывали тем же буфером, затем 0.05% раствором Triton X-100 и рекомбинантный белок растворяли в 6 M гуанидингидрохлориде, содержащем 5 mM 2-меркаптоэтанол. Раствор осветляли центрифугированием (12000 об/мин, 15 мин), а затем целевой белок ренатурировали диализом против 50 mM трис-HCl/0.1% Triton X-100 как описано в работе [11].

Выделение рекомбинантных белковых продуктов, содержащих гексагистидиновые домены, проводили металл-аффинной хроматографией на

Ni<sup>2+</sup>-NTA-агарозе в денатурирующих условиях в основном так, как описывалось ранее [10]. В экспериментах по ренатурации колонку с иммобилизованным на Ni<sup>2+</sup>-NTA-агарозе целевым белком после удаления примесей белковой природы последовательно промывали: буфером, содержащим 50 mM фосфат натрия, 10 mM трис-HCl, 8 M мочевины с понижающимся градиентом pH (8.0–6.0), а затем понижающимся линейным градиентом концентрации мочевины (7–0 M) в ренатурирующем буфере, содержащем 50 mM трис-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 5 mM 2-меркаптоэтанол и 0.05% Tween-20. Целевые полипептиды элюировали с колонки добавлением в тот же буфер имидазола до концентрации 200 mM. Фракции анализировали электрофорезом в ПААГ и иммуноферментным анализом. Фракции, содержавшие целевой белковый продукт, объединяли и диализовали как описано выше.

Хроматографию на колонке с белок-А-сефарозой проводили в соответствии с прилагаемой инструкцией. Элюцию связавшегося с сорбентом белка осуществляли 0.2 M раствором уксусной кислоты. Фракции, содержащие Fc-белок, объединяли и лиофилизовали.

Авторы признательны М.Ф. Турчинскому за предоставление конъюгата белка А и пероксидазы хрена, а также И.Н. Пашковой, В.С. Артамоновой и А.Б. Летуновой за участие в работе на отдельных стадиях эксперимента.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dougall W.C., Peterson N.C., Greene M.I. // Trends Biotechnol. 1994. V. 12. P. 372–379.
2. Cabilly S., Riggs A.D., Pande H., Shively J., Holmes W., Rey M., Perry L.J., Wetzel R., Heyneker L.H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 3273–3277.
3. Pluckthun A. // Methods: A Companion to Methods in Enzymology. 1991. V. 2. P. 88–96.
4. Anand A.A., Dubuc G., Phipps J., MacKenzie C.R., Sadowska J., Ypung N.M., Bundle D.R., Narang S.A. // Gene. 1991. V. 100. P. 39–44.
5. Персанов В.М., Кудрявцев Т.Ю., Абрамов В.М., Завьялов В.П. // Биотехнология. 1987. Т. 3. С. 627–631.
6. Capon D.J., Chamow S.M., Mordenti J., Marsters S.A., Gregory T., Mitsuya H., Byrn R.A., Lucas C., Wurm G.M., Groopman J.E., Broder S., Smith D.H. // Nature. 1989. V. 337. P. 525–531.
7. Ellison J.W., Berson B.J., Hood L.E. // Nucl. Acids Res. 1982. V. 10. P. 4071–4079.
8. McBride L.J., Kiczek A., Beausage S.L., Caruthers M.J. // J. Amer. Chem. Soc. 1986. V. 108. P. 2040–2048.
9. Reverdatto S.V., Beilinson V.A., Fradkov A.F., Polushin N.N., Efimov V.A. // Nucl. Acids Symp. Ser. 1991. P. 306–307.
10. Ефимов В.А., Фрадков А.Ф., Калинин А.Л., Чахмахчева О.Г. // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. С. 11–17.

11. Efimov V.A., Fradkov A.F., Raskind A.B., Khristin M.S., Klimov V.V., Chakhmakhcheva O.G. // FEBS Lett. 1994. V. 348. P. 153–157.
12. Ефимов А.В., Бурякова А.А., Пашкова И.Н., Полушин Н.Н., Чахмахчева О.Г. // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. С. 1070–1077.
13. Ovchinnikov Yu.A., Efimov V.A., Ivanova I.N., Reverdatto S.V., Skiba N.P., Chakhmakhcheva O.G. // Gene. 1984. V. 31. P. 65–78.
14. Чахмахчева О.Г., Бурякова А.А., Мирских О.В., Ревердатто С.В., Ефимов В.А., Овчинников Ю.А. // Биооргани. химия. 1985. Т. 11. С. 1533–1546.
15. Ефимов В.А., Мирских О.В., Бурякова А.А., Пашкова И.Н., Полушин Н.Н., Чахмахчева О.Г. // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. С. 90–103.
16. Ефимов В.А., Бурякова А.А., Полушин Н.Н., Пашкова И.Н., Дмитрикова Е.В., Чахмахчева О.Г. // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. С. 499–507.

## Artificial Gene, Biosynthesis, and Properties of Human Immunoglobulin G1 Fc Fragment

V. A. Efimov,<sup>1</sup> A. L. Kalinkina, A. F. Fradkov, and O. G. Chakhmakhcheva

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

**Abstract**—Chemicoenzymatic synthesis and cloning of a gene encoding the Fc domain of human immunoglobulin G1 were carried out. The artificial gene was expressed in *Escherichia coli* cells in plasmid vectors under control of a late T7 promoter. The recombinant protein isolated from the bacterial cells is capable of forming dimers and binding protein A from *Staphylococcus aureus*.

*Key words:* chemicoenzymatic synthesis, artificial gene, human immunoglobulin G1 Fc fragment, expression in *E. coli*.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed.