



## ИСКУССТВЕННЫЕ БЕЛКИ, ВОСПРОИЗВОДЯЩИЕ ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА $\alpha$ -ИНТЕРФЕРОНОВ

© 2003 г. Р. В. Черткова\*#, З. Х. Абдуллаев\*, Д. А. Долгих\*,  
В. П. Завьялов\*\*, М. П. Кирпичников\*

\*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

\*\*Кафедра биомедицинских технологий, Российский университет дружбы народов, Москва  
Поступила в редакцию 12.03.2002 г. Принята к печати 09.07.2002 г.

С целью создания искусственных белков с противовирусной активностью консенсусная последовательность LKDRHDF (30–36)  $\alpha$ -интерферонов (IFN- $\alpha$ ) человека была введена с помощью генно-инженерных методов в C- и N-концевые последовательности альбеферона – искусственного белка, уже содержащего IFN- $\alpha_2$ (130–137)-фрагмент LKEKKYSP (Dolgikh et al. Protein Engng. 1996. V. 9. P. 195–201) и обладающего сравнимой с IFN- $\alpha_2$  антипролиферативной активностью. В соответствии с данными КД-спектроскопии, оба новых белка имеют регулярную вторичную структуру, близкую к структуре белка-предшественника. Оба белка проявляют противовирусную активность, причем у одного из них она сопоставима с активностью IFN- $\alpha_2$ . В то же время полученные белки обнаруживают цитотоксические свойства лишь при относительно высоких концентрациях, существенно превышающих те, при которых наблюдается противовирусная активность.

**Ключевые слова:** искусственные белки, альбетин, альбеферон;  $\alpha_2$ -интерферон; противовирусная активность.

### ВВЕДЕНИЕ

$\alpha$ -Интерфероны человека – первые из цитокинов, полученные методами генной инженерии [1]. Противовирусная и противоопухолевая (антипролиферативная) активности  $\alpha$ -интерферонов – клинически важные свойства этих белков, благодаря которым они нашли применение в медицинской практике для лечения вирусных гепатитов В и С, а также некоторых форм злокачественных иммунопролиферативных заболеваний [2].

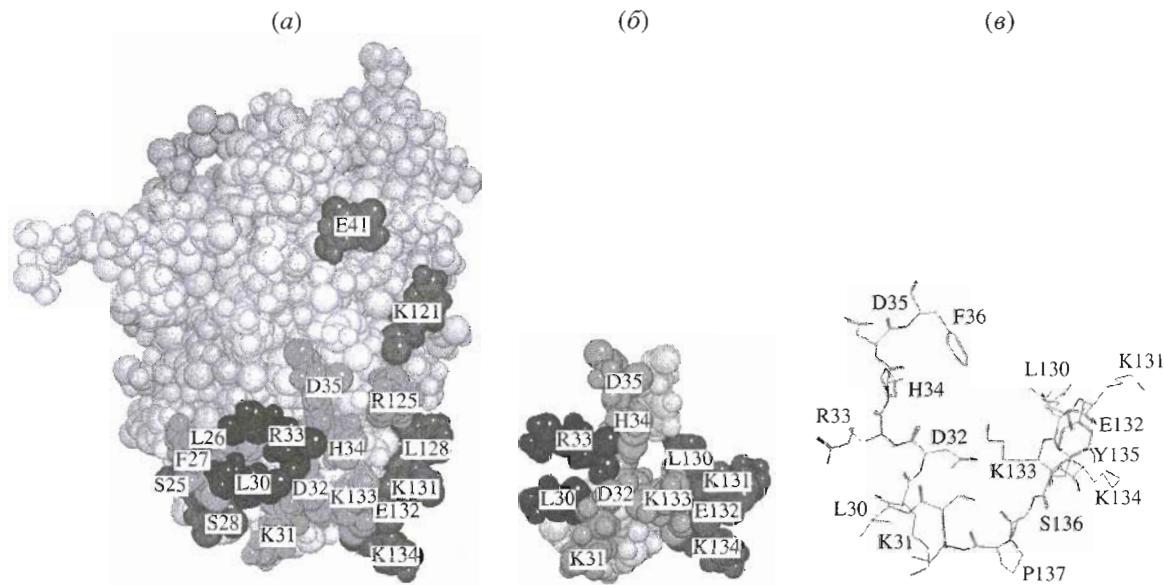
$\alpha$ -Интерфероны относятся к интерферонам типа I, который включает фибробластный, или  $\beta$ -интерферон (IFN- $\beta$ ), лейкоцитарный интерферон IFN- $\alpha_2$ , а также IFN- $\omega$  [2]. Все интерфероны типа I реализуют свои противовирусные свойства в результате взаимодействия с общим клеточным рецептором – IFNAR, состоящим из двух транс-

мембранных белков: IFNAR1 [3] и IFNAR2 [4]. IFN- $\alpha_2$  связывается с компонентами рецептора последовательно: вначале с IFNAR2, а затем с IFNAR1 [5]. Объединение субъединиц IFNAR1 и IFNAR2 в единый рецепторный комплекс активирует ассоциированные с ними цитоплазматические тирозинкиназы (JAK1 и TYK2), которые фосфорилируют друг друга, а также внутриклеточные части субъединиц комплекса (см. обзор [6]). Это, в свою очередь, приводит к фосфорилированию и активации латентных цитоплазматических факторов транскрипции (STAT1 и STAT2). Вместе с третьим компонентом (p48) они образуют комплекс, который активирует транскрипцию IFN-стимулируемых генов (см. обзор [6]).

Пространственная структура IFN- $\alpha_2$  расшифрована с помощью рентгеноструктурного анализа [7] и ЯМР-спектроскопии [8]. IFN- $\alpha_2$  принадлежит к классу  $\alpha$ -спиральных цитокинов [9–12], его глобулярная структура образована пятью  $\alpha$ -спиральями (A, B, C, D, E) [7, 8]. Данные, полученные с помощью изучения моноклональных антител к непрерывным эпипептидам [13–16], синтетических пептидов [17–21], естественных и искусственных мутантов [9–11, 22–24] (суммированы в обзорах [6, 25, 26]), свидетельствуют о том, что последовательности, соответствующие C-концевой части петли AB (а.о. 25–35), а также C-концевой части спирали D и N-концевой части петли DE (а.о. 121–134), вносят основной вклад в формирование цент-

Сокращения: ABB – искусственный белок альбетин; ABBI-I и ABBI-II – варианты альбеферона (ABBI), в которых консенсусная последовательность LKDRHDF из IFN- $\alpha$  введена в C- и N-концевые последовательности ABBI соответственно; EMC – вирус энцефаломиокардита мышей; TRX – тиродоксин; IFN- $\alpha_2$  –  $\alpha_2$ -интерферон человека; IFNAR1 и IFNAR2 – субъединицы рецепторного комплекса IFN- $\alpha_2$ ; IPTG – изопropилтио- $\beta$ -D-галактозид; PEI – полиэтиленимин; MCB – мальтозосвязывающий белок; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ЦПД<sub>50</sub> – цитопатическое действие вируса, вызывающее 50% деструкцию монослоя; ЦТД<sub>50</sub> – цитотоксическая доза, вызывающая деструкцию 50% клеток.

\*Автор для переписки (тел.: (095) 335-28-88; факс: (095) 335-50-33; эл. почта: rita@nmr.ru).



**Рис. 1.** Структура функционального эпитопа IFN- $\alpha_2$ , ответственного за его связывание с IFNAR2 и противовирусную активность (a), а также предполагаемая биологически активная конформация пептида ( $^{130}\text{LKEKKYSP}^{137}$ )-Ser-Ser- $^{130}\text{LKDRHDF}^{136}$ ), имитирующего функциональный эпитоп IFN- $\alpha_2$  (б и в). Пространственная структура IFN- $\alpha_2$  и пептида представлена с помощью пространственно заполненных (a, б) и скелетных (в) моделей на основе координат атомов аминокислотных остатков IFN- $\alpha_{2b}$  в растворе [8].

ра связывания с IFNAR2, а также в противовирусную и антиплифративную активности IFN- $\alpha_2$ . Пространственно эти последовательности находятся рядом и визуально образуют единый активный центр [7, 8, 24] (рис. 1a). По данным мутагенеза, остатки Arg33, Leu30 и Leu26 играют ключевую роль во взаимодействии с IFNAR2 и противовирусной активности [24]. Остатки Phe27, Lys31, Asp32, His34, Asp35, Arg125 и Lys133 также существенны для этих видов активности IFN- $\alpha_2$  [24]. Вклад остатков Ser25, Ser28, Lys121, Leu128, Lys131, Glu132 и Lys134 во взаимодействие с IFNAR2 и противовирусную активность минимален.

Синтетические пептиды, соответствующие последовательностям IFN- $\alpha_2$  – 124–138 (DRIT-LYLKEKKYSPC) [18, 20] и 130–137 (LKEKKYSP,  $\alpha$ -пептоферон) [21], в концентрациях  $10^{-9}$ – $10^{-8}$  М подавляют пролиферацию человеческой Т-лимфобластоидной линии клеток MT-4, но не обладают существенной противовирусной активностью. Следует отметить, что в опытах на тимоцитах мышь  $\alpha$ -пептоферон в концентрациях  $10^{-12}$ – $10^{-11}$  М вызывал противоположный эффект – усиливал их пролиферацию [17].

Последовательность IFN- $\alpha_2$ -(130–137) была введена нами ранее в N-концевую часть альбетина (ABB) – искусственного белка с не обнаруженной в природных белках заданной топологией, и обладающую достаточной стабильностью и компактностью [27]. Одним из возможных практических применений такой белковой конструкции, не обладающей собственной функциональной активностью, может быть использование ее в качестве “носите-

ля” биологически активных пептидов. Таким образом, нами был получен искусственный белок альбетерон (ABB1) [28]. Было показано, что ABB1 обладает более компактной и стабильной структурой, чем ABB [29], усиливает пролиферацию тимоцитов мыши в концентрациях более низких, чем IFN- $\alpha_2$  [30], и подавляет пролиферацию человеческой Т-лимфобластоидной линии клеток MT-4 в концентрациях  $10^{-9}$ – $10^{-8}$  М, что сопоставимо с антиплифративной активностью IFN- $\alpha_2$  [21].

В последние годы подчеркивается исключительно важная роль интерферонов типа I в регуляции иммунитета [31–33]. Они, в частности, стимулируют активность и дифференцировку антигенактивированных Th1-лимфоцитов. Интерфероны I типа способствуют созреванию самых эффективных антигенпредставляющих клеток – дендритных, происходящих из моноцитов, а также активируют В-лимфоциты [34, 35]. В то же время с иммуномодулирующими свойствами интерферонов, по-видимому, связаны некоторые весьма опасные побочные эффекты, наблюдаемые при лечении ими опухолей и вирусных инфекций. К таким эффектам относится образование аутоантител, большая часть которых взаимодействует с участками молекулы интерферона, не имеющими отношения к их противовирусному центру; развитие аутоиммунных заболеваний (аутоиммунный гепатит, тиреоидит, полимиозит, тромбоцитопения, ревматоидный артрит, красная волчанка [36–38]). В связи с этим актуальна проблема конструирования аналогов интерферонов типа I, избирательно воспроизводящих противовирусную или/и анти-

**Таблица 1.** Структура синтезированных олигонуклеотидов, использованных для конструирования генов искусственных белков ABBI-I и ABBI-II\*

Обозначение	Структура олигонуклеотида 5'-3'											
<i>Idp</i>	<i>Bam</i> HI CGGGGGATCC ATCGAGGGTAGG ATGCTG <i>Hind</i> III L K D R H D F											
<i>IrP</i>	CCT[AAGCTT]TCA[GAAGTCGTGACGGTCTTCAG]CGGAGACACTAACGTG <i>Bam</i> HI L K E K K Y S P S S											
<i>Idp-1</i>	CTG[GGATCC]ATCGAGGGTAGG ATG[CTGAAAGAAAAGAAGTACTCCCCG]TCCTCTC S S L K D R H D F											
<i>Idp-2</i>	GTACTCCCCGTCCCT[CTGAAAGACCGTCACGACTTC]GATCCGGCGACCCAG <i>Bg</i> II KpnI											
<i>dp-pET</i>	CCCAGATCTGGTAC[ATCGAGGGTAGG]ATG											

\* Показаны сайты рестрикции и последовательности, кодирующие вводимые пептидные фрагменты IFN- $\alpha_2$ : LKEKKYSP (130–137) и LKDRHDF (30–36); двойным подчеркиванием выделены перекрывающиеся участки праймеров *Idp-1* и *Idp-2*; участок, кодирующий сайт связывания протеиназы фактора Xa, выделен зачернением.

пролиферативную активности этих белков, но лишенных большей части участков, ответственных за выработку аутоантител к интерферонам и провоцирующих перечисленные выше аутоиммунные заболевания.

Настоящая работа посвящена моделированию функционального эпитопа – противовирусного центра связывания  $\alpha$ -интерферонов на основе искусственного белка ABB как носителя формирующих этот центр аминокислотных последовательностей. Используя белок ABBI в качестве исходного, мы получили два варианта белковых конструкций с разным расположением пептидного фрагмента LKDRHDF (30–36) консенсусной последовательности  $\alpha$ -интерферонов: в C-конце молекулы (ABBI-I) и в N-конце, непосредственно после фрагмента (130–137) (ABBI-II). Для того чтобы фрагменты (130–137) и (30–36) в белке ABBI-II могли занять относительно друг друга пространственное расположение, аналогичное расположению в молекуле IFN- $\alpha_2$ , между двумя фрагментами были введены два остатка Ser, моделирующих дисульфидную связь Cys29 и Cys138 IFN- $\alpha_2$ . На рис. 1б и 1в показана предполагаемая биологически активная конформация пептида (<sup>130</sup>LKEKKYSP<sup>137</sup>)-Ser-Ser-(<sup>30</sup>LKDRHDF<sup>36</sup>), воспроизводящего противовирусный центр IFN- $\alpha$  [24].

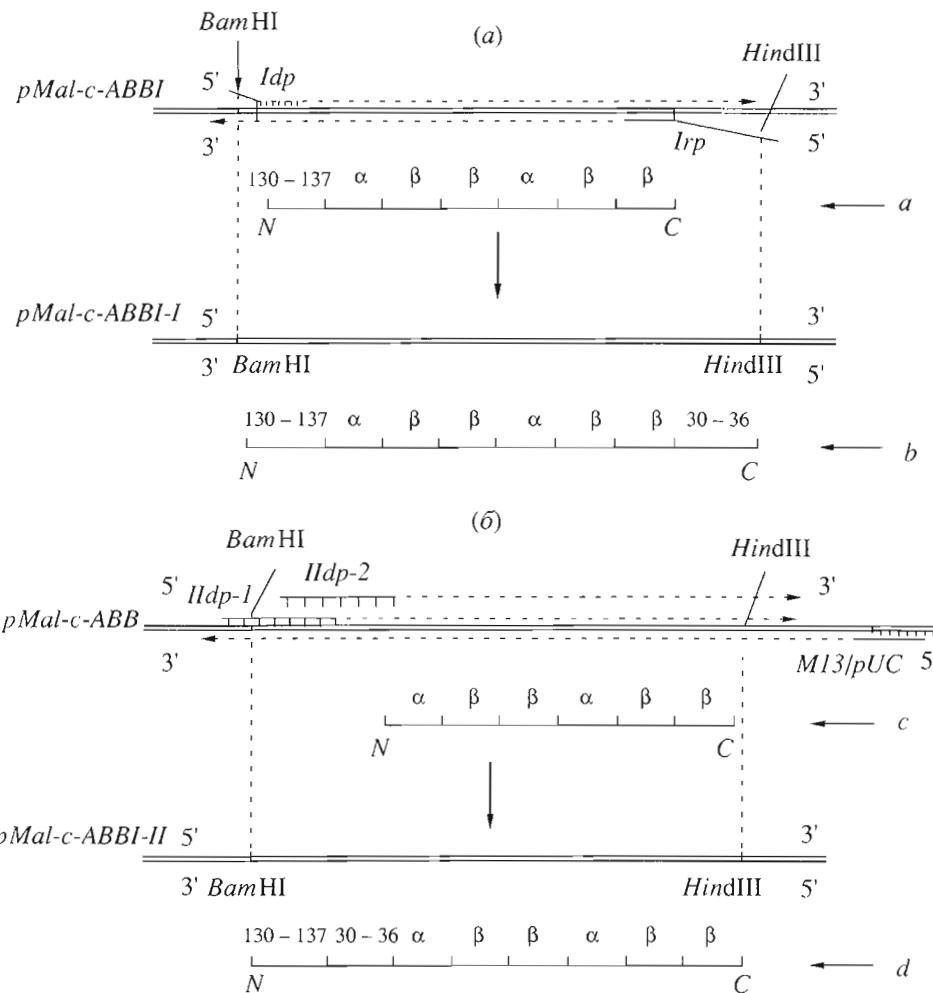
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Генно-инженерные конструкции для экспрессии генов белков ABBI-I и ABBI-II. Ранее нами был сконструирован ген белка ABB [27], затем, путем введения с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) олигонуклеотида, кодирующего фрагмент IFN- $\alpha_2$ -(130–137)-LKEKKYSP [28], был по-

лучен ген белка ABBI [30]. Гены искусственных белков были введены в плазмидный вектор для экспрессии *pMal-c* (New England Biolabs, США) по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Hind*III (ABB) и *Eco*RI и *Hind*III (ABBI). В нашей работе на основе этих конструкций и синтезированных олигонуклеотидных праймеров, содержащих кодирующие пептидные фрагменты последовательности (130–137) и (30–36) (табл. 1), были созданы гены новых искусственных белков ABBI-I и ABBI-II.

Для получения гена белка ABBI-I в область гена белка ABBI, соответствующую C-концу его полипептидной цепи, методом ПЦР была введена последовательность, кодирующая пептидный фрагмент IFN- $\alpha_2$ -(30–36). Схема реакции ПЦР приведена на рис. 2а. В качестве матрицы в реакции использовали плазмидный вектор *pMal-c-ABBI* (New England Biolabs, США), содержащий ген белка ABBI; в качестве прямого праймера – секвенирующий праймер *MalE* (New England Biolabs, США), а обратный праймер *IrP* содержал сайт рестрикции *Hind*III, участок, кодирующий вводимый фрагмент (30–36)-LKDRHDF, и участок, соответствующий 3'-концевой части гена белка ABBI.

Для конструирования гена второго варианта белка, в котором оба фрагмента располагаются на N-концевой части молекулы белка ABBI и соединены двумя остатками серина (–Ser–Ser–), были синтезированы два прямых перекрывающихся праймера (*Idp-1* и *Idp-2*) (табл. 1). Праймер *Idp-1* содержал сайт рестрикции *Bam*HI и последовательность, кодирующую фрагмент (<sup>130</sup>LKEKKYSP<sup>137</sup>–S–S–), а праймер *Idp-2* – часть этой последовательности и последовательность, кодирующую второй фрагмент (<sup>30</sup>LKDRHDF<sup>36</sup>) (выделены двойным подчёр-



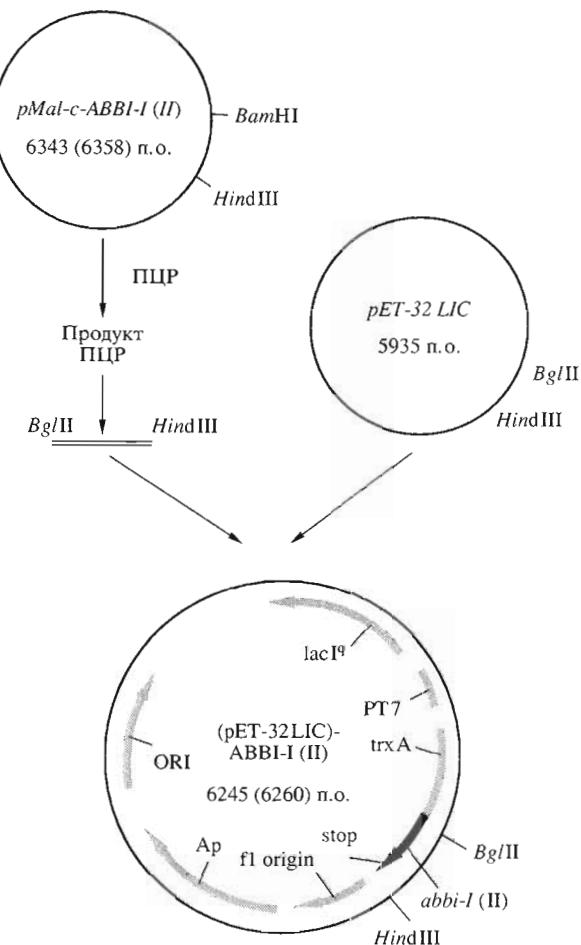
**Рис. 2.** Схемы проведения ПЦР, с помощью которых в составе матричной плазмиды *pMal-c* были получены ген белка ABBI-I на основе гена белка ABBI (а) и ген белка ABBI-II на основе гена белка ABB (б); стрелки *a*, *b*, *c*, *d* – введение олигонуклеотидных последовательностей, кодирующих элементы вторичной структуры белков ABBI, ABBI-I, ABB и ABBI-II соответственно.

киванием). В качестве обратного праймера использовали обратный секвенирующий праймер *M13/pUC* (New England Biolabs, США), а в качестве матрицы – плазмидный вектор *pMal-c-ABB*, несущий ген белка ABB (рис. 2б).

Продукты обеих ПЦР обрабатывали рестриктазами *Bam*HI и *Hind*III и вводили в плазмидный вектор *pMal-c*, также обработанный этими рестриктазами. Этот вектор позволяет экспрессировать ген целевого белка в слитном виде с геном малтозосвязывающего белка (МСБ). Однако конечный выход искусственных белков при использовании этой системы оказался недостаточным. Одной из причин малого выхода является значительное различие молекулярных масс МСБ (~45 кДа) и целевых белков (~9 кДа). В связи с этим было решено использовать другую конструкцию для слитной экспрессии, позволяющую

применять удобную схему выделения и очистки и получать высокий выход искусственных белков.

В качестве такой конструкции был взят плазмидный вектор *pET-32 L/C* (Novagen, США), использованный нами ранее для наработки альбебетина, содержащего другой биологически активный пептид – фрагмент фактора дифференцировки HLDF [39]. Рекомбинантный ген в этом векторе находится под контролем сильного промотора бактериофага T7 в слитном виде с геном тиоредоксина (TRX) – белка, обладающего примерно втрое меньшей молекулярной массой, чем МСБ. Таким образом, этот вектор позволяет экспрессировать ген целевого белка в виде единой полипептидной цепи (гибрида) с TRX. В состав гибридного белка также входит последовательность из шести остатков His для быстрой и эффективной очистки гибридного белка с использованием металлхелатной хроматографии на колонке с никель-



**Рис. 3.** Общая схема субклонирования генов белков ABBI-I и ABBI-II в экспрессионный плазмидный вектор *pET-32 LIC*.

нитрилтриацетатагарозой (Ni-NTA-SF). Уровень экспрессии гибридного белка в такой конструкции достаточно высок, максимальный выход достигает 40–50% общей массы клеточных белков [39], что позволяет наработать целевые белки в количествах, необходимых для исследований.

В целях удобства клонирования в плазмиду *pET-32 LIC* в оба гена искусственных белков с помощью ПЦР был введен сайт рестрикции *Bgl*II. Для этого синтезирован прямой праймер *dP-pET*; в качестве обратного праймера в обоих случаях использовался секвенирующий праймер *M13/pUC*, а в качестве матрицы – плазмид *pMal-c*, несущая соответствующий ген. Продукты обеих ПЦР обрабатывали рестриктазами *Bgl*II и *Hind*III и вводили в плазмидный вектор *pET-32 LIC*, также обработанный этими рестриктазами (рис. 3). Полученные плазмидные конструкции проверяли секвенированием на наличие нужных вставок и использовали для трансформации *E. coli*. Таким образом, в составе описанной экспрессионной конструкции были получены гены двух вариан-

тов белка ABBI, несущего пептидный фрагмент IFN- $\alpha$ -(30–36) из консенсусной последовательности IFN- $\alpha_2$ . Схематичное изображение этих белковых конструкций, а также исходного белка ABBI представлено на рис. 4.

**Экспрессия рекомбинантных генов.** Наработку искусственных белков ABBI, ABBI-I и его вариантов ABBI-I и ABBI-II в виде гибридов с TRX осуществляли в штамме *E. coli* BL21(DE3) *pLysS* подобно тому, как описано в работе [39]. В результате оптимизации условий биосинтеза было обнаружено, что максимальный выход гибридных белков (до 40–50% общей массы клеточных белков согласно электрофоретическому анализу в SDS-ПААГ) достигается за 8–9 ч в питательной среде TB при 0.6–0.7 mM концентрации индуктора IPTG и 37°C.

**Выделение и очистка искусственных белков.** Искусственные белки, полученные в виде единой полипептидной цепи с TRX, очищали с помощью жидкостной хроматографии на колонке с анионообменным сорбентом Mono Q HR, а затем на колонке с металлокхелатным сорбентом Ni-NTA-SF. Полученный слитный белок подвергали расщеплению протеиназой фактора Xa, после чего реакционную смесь наносили на колонку с Ni-NTA-SF [39]. По данным электрофоретического анализа, чистота искусственных белков после разделения на металлокхелатной колонке составляла около 90%, поэтому для получения более чистого белка введена дополнительная хроматография на анионообменном сорбенте Mono Q HR.

Согласно данным масс-спектрометрии, молекулярные массы полученных белков соответствовали рассчитанным и составляли 9.3 и 9.8 kDa для ABBI-I и ABBI-II соответственно. Гомогенность полученных препаратов была подтверждена электрофоретически, а кроме того, был проведен анализ *N*-концевых аминокислотных последовательностей методом секвенирования. При этом удалось определить девять *N*-концевых аминокислотных остатков: Met-Leu-Lys-Glu-Lys-Tyr-Ser-Pro- (для обоих белков они совпадают). Таким образом, была разработана схема выделения и очистки искусственных белков, позволяющая получать до 15 мг белка с 1 л клеточной супензии.

**Спектры КД искусственных белков.** Данные КД-спектроскопии белков ABBI, ABBI-I и ABBI-II в дальней УФ-области, приведенные на рис. 5, показывают, что искусственные белки имеют схожие спектры, характерные для белков со значительным содержанием регулярной вторичной структуры. Расчет спектров по методике Провенчера и Глокера [40] показал, что содержание  $\alpha$ - и  $\beta$ -структур в новых искусственных белках ABBI-I и ABBI-II составляет 29 и 23% ( $\alpha$ ) и 30 и 38% ( $\beta$ ) соответственно; в то же время белок ABBI содержит 27%  $\alpha$ - и 35%  $\beta$ -структур [29] (табл. 2). Полученные значения хорошо согласуются с эксперименталь-

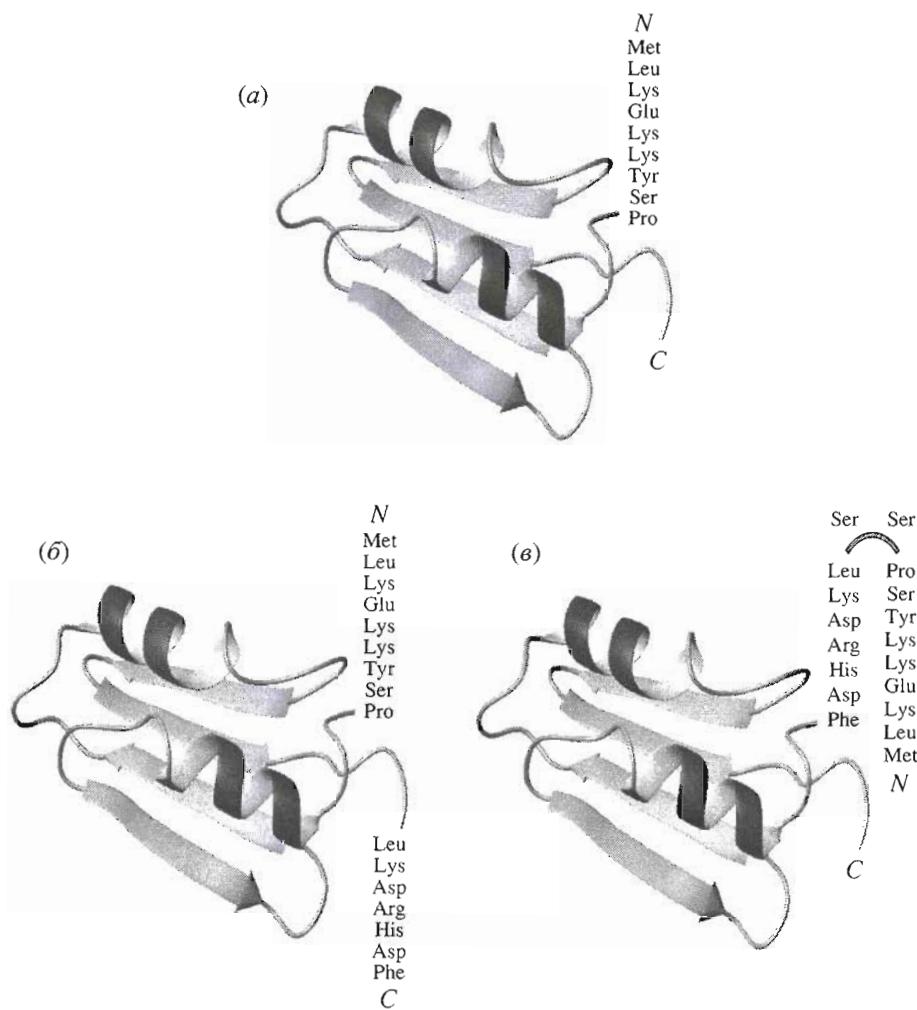


Рис. 4. Схематичное изображение пространственных структур искусственных белков ABBI (а), ABBI-I (б) и ABBI-II (в), несущих в составе *C*- и *N*-концевых последовательностей пептидные фрагменты IFN- $\alpha_2$ .

ными и расчетными данными, полученными ранее в ходе исследования белка АВВ [28]: из анализа его предполагаемой структуры следует, что молекула этого белка должна содержать 30%  $\alpha$ - и 36%  $\beta$ -структур; экспериментальные данные отличались от расчетных незначительным образом – 29 и 40% соответственно. Таким образом, полученные нами данные позволяют предположить, что введение второго фрагмента IFN- $\alpha_2$  (30–36) в молекулу белка ABBI не повлияло существенным образом на его вторичную структуру.

*Противовирусные и цитотоксические свойства полученных белков.* Тестирование противовирусной активности искусственных белков проводили *in vitro* по методу, выявляющему способность препарата подавлять цитопатическое действие тест-вируса [41]. В экспериментах использовали две клеточные линии: клетки мононуклеарного лейкоза человека L-41 и клетки почки зеленой мартышки VERO. В качестве тест-вируса был выбран вирус энцефаломиокардита мышей, об-

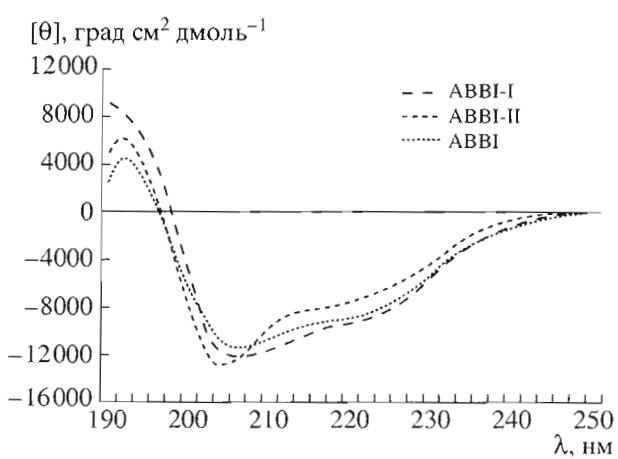


Рис. 5. Спектры КД белков ABBI, ABBI-I и ABBI-II в дальней УФ-области. Измерения проводились в 20 мМ  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 7.9, при 20°C. Концентрации белков составляли 1 мг/мл, толщина кюветы – 1 мм.

**Таблица 2.** Относительное содержание элементов регулярной вторичной структуры искусственных белков ABB, ABBI, ABBI-I и ABBI-II\*

Исследуемый белок	Содержание вторичной структуры, %	
	α-структура	β-структура
ABB <sub>теор</sub>	30	36
ABB***	29	40
ABBI***	27	35
ABBI-I	29	30
ABBI-II	23	38

\* Погрешность расчетов вторичной структуры не превышала 1.8%.

\*\* Значения содержания α- и β-структур для белка ABB, полученные путем анализа ожидаемой структуры [28].

\*\*\* Значения содержания α- и β-структур для белков ABB и ABBI определены в работе [29].

ладающий коротким циклом размножения и высокой чувствительностью к действию интерферонов. В качестве положительного контроля противовирусной активности были выбраны человеческие рекомбинантные IFN- $\alpha_2$  и IFN- $\gamma$ . Результаты, приведенные в табл. 3, демонстрируют наличие противовирусных свойств у обоих вариантов искусственного белка, хотя и выраженных в разной степени. Противовирусная активность ABBI-I – варианта, в котором фрагмент LKDRHDF располагается в C-концевой последовательности ABBI, на два порядка ниже по сравнению с ABBI-II, в котором этот фрагмент располагается в N-концевой последовательности после фрагмента LKEKKYSP и отделен от последнего вставкой из двух остатков серина (см. рис. 1б и 1в, а также рис. 4). По сравнению с рекомбинантным IFN- $\alpha_2$  противовирусная активность искусственного белка ABBI-II всего лишь на один порядок ниже, что находится в пределах отличий, наблюдаемых для различных субтипов IFN- $\alpha$  [2]. Активность всех препаратов (рекомбинантного IFN- $\alpha_2$ , ABBI, ABBI-I и ABBI-II), выраженная в международных единицах, была рассчитана с использованием интерферонового стандарта человеческого лейкоцитарного IFN- $\alpha_2$  (рис. 6). Необходимо отметить, что исходный белок ABBI также обнаружил слабые противовирусные свойства.

Цитотоксические дозы ( $ЦТД_{50}$ ) препаратов определяли как концентрацию препарата, вызывающую деструкцию 50% клеток после 24 ч контакта с ними в отсутствие вируса [42]. Показано, что все четыре искусственных белка обнаруживают цитотоксические свойства лишь при сравнительно высоких концентрациях, превышающих  $8 \times 10^{-5}$  М (табл. 4). В частности, цитотоксичность ABBI-II наблюдается при концентрациях, в миллион раз превышающих те, которые необходимы для проявления противовирусного действия этого белка.

Таким образом, в результате работы сконструировано два варианта искусственного белка, один из которых (ABBI-II) практически полностью воспроизводит противовирусные свойства человеческих IFN- $\alpha$ . Получены генно-инженерные конструкции, содержащие гены этих белков, и разработана эффективная система их биосинтеза, выделения и очистки, что позволило наработать оба варианта в количествах, достаточных для анализа противовирусных и цитотоксических свойств. Как уже было отмечено выше, вариант искусственного белка ABBI-II, в котором оба фрагмента LKEKKYSP (130–137) и LKDRHDF (30–36) IFN- $\alpha_2$  расположены в N-концевой части молекулы последовательно друг за другом, имеет на два порядка более высокую противовирусную активность по сравнению с вариантом ABBI-I, в котором фрагменты активного центра IFN- $\alpha_2$  располагаются на противоположных концах белковой молекулы. Можно предположить, что расположение

**Таблица 3.** Противовирусные свойства искусственных белков и интерферонов в культурах клеток почки зеленой мартышки VERO и мононуклеарного лейкоза человека L-41\*

Тестируемый препарат	Противовирусная активность (минимальная концентрация, М)	
	культура L-41	культура VERO
ABBI	$(1.3 \pm 0.6) \times 10^{-5}$	$(8.5 \pm 6.8) \times 10^{-5}$
ABBI-I	$(2.9 \pm 1.3) \times 10^{-8}$	$(1.5 \pm 0.7) \times 10^{-8}$
ABBI-II	$(1.4 \pm 0.4) \times 10^{-10}$	$(1.4 \pm 0.5) \times 10^{-10}$
IFN- $\alpha_2$	$(5.5 \pm 3.6) \times 10^{-11}$	$(1.1 \pm 0.4) \times 10^{-11}$
IFN- $\gamma$	$(1.1 \pm 0.5) \times 10^{-10}$	$(1.5 \pm 0.9) \times 10^{-9}$

\* Активность препаратов определялась как минимальная концентрация, которая вызывает задержку ЦПД вируса EMC на 50%. Приведены средние значения трех независимых экспериментов  $\pm$  стандартные отклонения от среднего.

**Таблица 4.** Цитотоксические свойства искусственных белков ABB, ABBI, ABBI-I и ABBI-II\*

Тестируемый препарат	Цитотоксическая доза ( $ЦТД_{50}$ ), М	
	культура L-41	культура VERO
ABB	$\geq 8.7 \times 10^{-5}$	$\geq 8.5 \times 10^{-5}$
ABBI	$\geq 8.8 \times 10^{-5}$	$\geq 8.8 \times 10^{-5}$
ABBI-I	$\geq 8.9 \times 10^{-5}$	$\geq 9.0 \times 10^{-5}$
ABBI-II	$\geq 1.4 \times 10^{-4}$	$\geq 1.2 \times 10^{-4}$

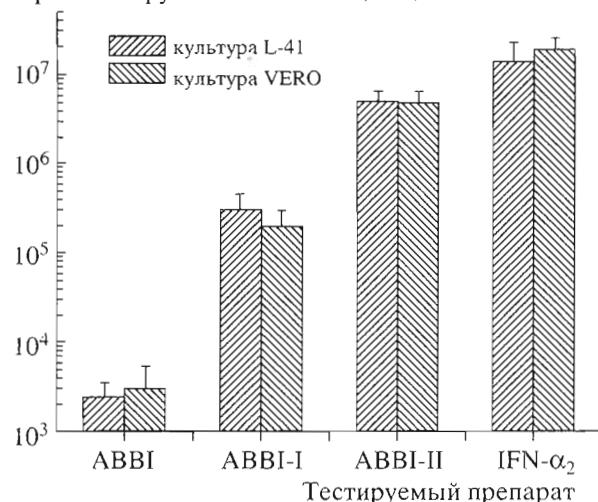
\* Цитотоксические дозы были определены по минимальным концентрациям препаратов, вызывающим деструкцию 50% клеточного монослоя в отсутствие вируса EMC.

жение фрагментов в ABBI-I создает определенные стерические или/и кинетические ограничения для их объединения в единый противовирусный центр. Этот результат согласуется с данными, свидетельствующими о влиянии дисульфидной связи между остатками Cys29 и Cys139 на биологическую активность интерферонов типа I. Так, например, мутантный мышиный IFN- $\beta$ , в который дисульфидная связь введена генно-инженерными методами, обладает в 10 раз более высокой биологической активностью, чем рекомбинантный мышиный IFN- $\beta$  дикого типа [43], в котором данная связь отсутствует. В последовательности ( $^{130}$ LKEKKYSP $^{137}$ )-Ser-Ser-( $^{30}$ LKDRHDF $^{36}$ ) функцию дисульфидной связи между остатками Cys29 и Cys138 выполняет пептидная связь между заменившими их остатками серина. Данные рентгеноструктурного анализа свидетельствуют о том, что в кристалле IFN- $\alpha_2$  атомы Оδ1 и Оδ2 боковой цепи остатка Asp32 уложены в виде сандвича между N $\zeta$ -группами остатков Lys31 и Lys133 [7]. Эти взаимодействия могут стабилизировать биологически активную конформацию последовательности ( $^{130}$ LKEKKYSP $^{137}$ )-Ser-Ser-( $^{30}$ LKDRHDF $^{36}$ ) белка ABBI-II при образовании комплекса с IFNAR2.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в формирование противовирусного центра вносят вклад оба фрагмента (130–137)- и (30–36)-IFN- $\alpha_2$ , однако вклад фрагмента (30–36) преобладает, что совпадает с данными мутагенеза [24]. В то же время фрагмент (130–137) воспроизводит антипролиферативную активность IFN- $\alpha_2$  на человеческой Т-лимфобластоидной линии клеток MT-4 [21]. Этот результат наших исследований согласуется с данными, свидетельствующими в пользу того, что С-концевая часть молекулы IFN- $\alpha_2$  от 75 до 166 а.о. критична для антипролиферативной активности этого белка [44].

В целом, полученные результаты демонстрируют принципиальную возможность конструирования искусственных белков с заданной биологической активностью. Воспроизведение искусственными белками противовирусных и антипролиферативных свойств интерферонов позволяет использовать эти белки как инструменты в дальнейших детальных исследованиях механизмов индукции внутриклеточных сигналов, ведущих к проявлению вышеназванных активностей интерферонов. Кроме этого, высокая биологическая активность искусственных белков является основой для их изучения в качестве новых лекарственных препаратов. Преимущество этих белков – отсутствие потенциальной возможности провоцировать выработку аутоантител к участкам интерферонов, не имеющих отношения к противовирусной и антипролиферативной активности.

Противовирусная активность, МЕ/мг



**Рис. 6.** Противовирусные свойства искусственных белков в культурах клеток почки зелено-мартишки VERO и мононуклеарного лейкоза человека L-41. Активность белков ABBI, ABBI-I, ABBI-II и рекомбинантного IFN- $\alpha_2$  рассчитана с использованием интерферонового стандарта лейкоцитарного IFN- $\alpha_2$  человека, исходя из минимального титра препарата, при котором наблюдалась задержка ЦПД вируса EMC на 50%. Приведены средние значения трех независимых экспериментов  $\pm$  стандартные отклонения от среднего.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы реактивы производства фирм ICN (США), Sigma (США), Serva (США), Bio-Rad (США), а также Реахим (Россия); ферменты: протеиназа фактор Xa (New England Biolabs, США), эндонуклеазы рестрикции (Stratagene, Promega, США), ДНК-полимераза *Pfu* (Stratagene, США). Дистиллированную воду дополнительно очищали с помощью системы Milli-Q (Millipore, США).

**Препараты** интерферонового стандарта человеческого лейкоцитарного IFN- $\alpha_2$ , рекомбинантные IFN- $\alpha_2$  и IFN- $\gamma$  были любезно предоставлены М.В. Мезенцевой (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва).

**Штаммы бактерий и ростовые среды.** В работе использовали штаммы бактерий *E. coli*: XL-1 Blue (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, (*lac<sup>-</sup>*)) (Stratagene, США) и BL-21(DE3) *pLysS* (*F<sup>-</sup>*, *ompT*, *hsdS<sub>B</sub>*, (*r<sub>B</sub><sup>-</sup>*, *m<sub>B</sub><sup>-</sup>*), *gal*, *dcm*, (DE3), *pLysS*) (Novagen, США). Клетки *E. coli* выращивали в средах LB, SOB или TB [45], в зависимости от задачи; твердые среды содержали 1.5% агара. При необходимости в среду добавляли антибиотики: ампициллин (100 мкг/мл) и/или хлорамфеникол (30 мкг/мл).

**Конструирование генов и векторов.** Все генно-инженерные работы (выделение и секвенирование плазмид, трансформацию бактериальных штаммов) выполняли по стандартным методикам [45].

Для проведения ПЦР использовали праймеры, приведенные в табл. 1. Реакционная смесь в объеме 50 мкл содержала 1 пмоль матричной ДНК, по 10 пмоль праймеров, по 10 нмоль каждого из четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов и 1 ед. акт. ДНК-полимеразы *Pfu* в буфере для *Pfu*-полимеразы: 20 мМ Трис-HCl, pH 8.75, 2 мМ MgSO<sub>4</sub>, 10 мМ KCl, 10 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% Тритон X-100, 200 мкг/мл BSA. Цикл амплификации включал в себя денатурацию ДНК при 95°C (1 мин), отжиг при 56°C (1 мин) и элонгацию при 70°C (30 с). Всего проводили 30 циклов реакции. Реакционную смесь наносили на агарозный гель для разделения электрофорезом, и нужные фрагменты выделяли из геля с помощью QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия).

**Экспрессия рекомбинантных генов.** Клетки штамма *E. coli* BL21(DE3) *pLysS*, трансформированные рекомбинантными плазмидами, содержащими гены белков ABB, ABBI и двух вариантов ABBI-I и ABBI-II, выращивали в среде Terrific broth (TB) (12 г/л бактотриптона, 24 г/л дрожжевого экстракта, 0.04% глицерина и 1/10 объема раствора фосфатов: 0.17 М K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.72 М K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4) до *A*<sub>550</sub> 0.5–0.6. Экспрессию генов гибридных белков индуцировали, добавляя в клеточную суспензию IPTG до конечной концентрации 0.6 мМ. Индуцированную культуру выращивали при 37°C и хорошей аэрации в течение 8–9 ч, после чего клеточную биомассу осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 4000 g.

**Выделение и очистка белков.** Клеточный осадок ресуспендировали в буфере для лизиса (50 мМ Трис-HCl, pH 7.8, 2 мМ EDTA, 100 мМ NaCl, 0.1 мМ фенилметилсульфонилфторид). Полученную суспензию гомогенизировали с помощью ультразвукового дезинтегратора, клеточный дебрис осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 25000 g. К супернатанту добавляли полиэтиленимин (PEI) до конечной концентрации 0.01%, смесь инкубировали в течение 30 мин при 4°C и постоянном перемешивании, после чего осадок комплекса PEI с нуклеиновыми кислотами и частью клеточных белков удаляли центрифугированием в течение 15 мин при 25000 g.

Выделение и очистку белков проводили на автоматическом хроматографе Bio-Logic (Bio-Rad, США). Полученный клеточный экстракт наносили на ионообменную колонку Mono Q HR 16/10 (Pharmacia, Швеция). Гибридные белки элюировали в линейном градиенте концентрации NaCl (0.26–0.58 M) со скоростью 2 мл/мин в буфере для элюции (25 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 1 мМ NaN<sub>3</sub>). Фракции, обогащенные гибридным белком, дialisовали против 50 мМ Трис-HCl-буфера, pH 8.0, содержащего 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, 1 мМ NaN<sub>3</sub>, концентрировали и наносили на колонку, заполненную Ni-NTA-SF (Qiagen, Германия). Металлхелатную очистку проводили согласно протоколу фирмы-производителя;

фракции, содержащие гибридный белок, дialisовали против буфера для протеолиза (25 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 50 мМ NaCl, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ NaN<sub>3</sub>). Энзиматическое расщепление гибридных белков протеиназой фактора Ха и последующее разделение TRX и целевого белка с помощью металлхелатной хроматографии на колонке с Ni-NTA-SF осуществляли согласно протоколам фирм-производителей (New England Biolabs, США и Qiagen, Германия). Дополнительной очистки препарата белка достигали на колонке Mono Q HR (Bio-Rad, США), заполненной анионообменным сорбентом. Образец наносили на колонку в 25 мМ Трис-HCl, pH 8.0, содержащем 1 мМ NaN<sub>3</sub>, и элюировали в линейном градиенте концентрации NaCl (0.29–0.38 M) в том же буфере со скоростью 1 мл/мин. Очищенные белки при необходимости концентрировали и дialisовали против 20 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 7.9.

**Аналитические методы.** Концентрацию гибридных белков, белков ABBI, ABBI-I и ABBI-II определяли по поглощению при длине волны 280 нм с учетом расчетного молярного коэффициента поглощения. Концентрацию белка ABB определяли путем сравнения оптического поглощения при длинах волн 215 и 225 нм [46].

Все этапы наработки, выделения и очистки белков контролировали с помощью электрофореза в 12% полиакриламидном геле в присутствии 0.1% додецилсульфата натрия по Лэммли [47] и в 12% геле в Трис-трициновой буферной системе [48]. Анализ N-концевых аминокислотных последовательностей полученных белков проводили автоматической деградацией по Эдману [49] с использованием газофазного секвенатора 470A (Applied Biosystems, США).

**Спектры кругового дихроизма** в дальней УФ-области (190–250 нм) были получены с помощью спектрополяриметра Jasco-500C (Japan Spectroscopic Corp., Япония), оборудованного термостатируемой ячейкой. Концентрации белков в исследуемых образцах составляли 1 мг/мл. Измерения проводили в 20 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 7.9, при 20°C, в кювете с длиной оптического пути 1 мм. Относительное содержание элементов регулярной вторичной структуры исследуемых белков рассчитывали по методике Провенчера и Глокера [40].

**Культивирование клеточных линий.** Клеточные линии мононуклеарного лейкоза человека L-41 и клетки почки зелено-мартышки VERO культивировали во влажной атмосфере воздуха с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C в среде RPMI-1640, содержащей 10 мМ НЕПЕС, 0.2% NaHCO<sub>3</sub>, 2 мМ L-глутамин, 2 мМ пируват натрия, 50 мкг/мл гентамицина, 10% инактивированную эмбриональную сыворотку теленка. Концентрация клеток для инициации роста составляла 2 × 10<sup>3</sup> клеток/мл. Клетки инкубировали в 96-луночных планшетах в течение 24 ч до достижения полного монослоя, состояния которого контролировали при просмотре на инвертированном микроскопе.

**Противовирусную активность** искусственных белков исследовали в диапазоне концентраций от  $10^{-4}$  до  $10^{-11}$  М. По достижении монослоя к клеткам добавляли препарат тестируемого белка – в первую лунку в исходной концентрации, далее титровали 24 лунки с шагом 1/2, так что концентрация препарата в каждой последующей лунке была вдвое меньше, чем в предыдущей. Через 24 ч инкубации культуры во влажной атмосфере воздуха с 5%  $\text{CO}_2$  при 37°C клетки инфицировали дозой EMC, равной 100 ЦПД<sub>50</sub>, и инкубировали в течение 24 ч при тех же условиях. После инкубации проводили визуальный учет ЦПД, вызванного вирусом и определяли минимальную концентрацию препарата, при которой наблюдается задержка ЦПД вируса на 50%, а также титр (для препаратов рекомбинантного IFN- $\alpha_2$ , ABBI, ABBI-I и ABBI-II). За титр принимали число, обратное его наибольшему разведению, вызывающему задержку ЦПД вируса на 50%. В качестве интерферонового стандарта использовали человеческий лейкоцитарный IFN- $\alpha_2$ , 1000 МЕ/мл. Активность, выраженную в международных единицах (МЕ/мг), рассчитывали, исходя из экспериментального титра по формуле:  $A = C_t \times A_p / P$ , где  $C_t$  – титр интерферонового стандарта;  $A_p$  – титр исследуемого интерферона в опыте;  $P$  – титр стандарта в опыте [41].

**Определение цитотоксической активности.** По достижении монослоя к клеткам добавляли препарат аналогично тому, как это делалось в эксперименте по определению противовирусной активности. Затем культуру клеток инкубировали в течение 24 ч во влажной атмосфере воздуха с 5%  $\text{CO}_2$  при 37°C. После инкубации с препаратом белка культуры просматривали в инвертированном микроскопе при малых увеличениях для определения цитодеструктивного эффекта действия препарата [42].

**Построение молекулярных моделей.** Молекулярные модели пространственной структуры функционального эпитопа IFN- $\alpha_2$ , а также предполагаемой биологически активной конформации пептида (<sup>130</sup>LKEKKYSP<sup>137</sup>)-Ser-Ser-(<sup>30</sup>LKDRHDF<sup>36</sup>), имитирующего функциональный эпитоп IFN- $\alpha_2$ , были построены с помощью программы Chem-X (Chemical Design Ltd., Англия) на основе координат атомов соответствующих аминокислотных остатков IFN- $\alpha_{2b}$  в растворе [8].

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа проводилась при частичной финансовой поддержке Международного научно-технического центра (ISTC) и Международного центра генной инженерии и биотехнологии (ICGEB).

Авторы выражают благодарность М.В. Мензевой (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва) за исследование биологической активности белков, В.М. Абрамову

(Институт инженерной иммунологии, Любучаны, Московская обл.) за помощь в организации этих исследований, Н.С. Быстрову за синтез олигонуклеотидов, Ю.Ф. Леоновой за определение N-концевой аминокислотной последовательности, И.А. Куделиной за помощь при измерении КД-спектров, а также Г.А. Завьяловой за молекулярное моделирование конформации пептида, имитирующего функциональный эпитоп IFN- $\alpha_2$ .

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Taniguchi T., Mantei N., Schwarzstein M., Nagata S., Murmatsu M., Weissmann C. // Nature. 1980. V. 285. P. 547–549.
2. Pestka S., Langer J., Zoon K., Samuel C. // Ann. Rev. Biochem. 1987. V. 56. P. 727–777.
3. Uze G., Lutfalla G., Mogensen K. // Cell. 1990. V. 60. P. 225–234.
4. Novick D., Cohen B., Rubinstein M. // Cell. 1994. V. 77. P. 391–400.
5. Cohen B., Novick D., Barak S., Rubinstein M. // Mol. Cell. Biol. 1995. V. 15. P. 4208–4214.
6. Zav'yalov V., Denesyuk A., Zav'yalova G. // Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 1997. V. 105. P. 161–186.
7. Radhakrishnan R., Walter L., Hruza A., Reichert P., Trotta P., Nagabhushan T., Walter M. // Structure. 1996. V. 4. P. 1453–1463.
8. Klaus W., Gsell B., Labhardt A., Wipf B., Senn H. // J. Mol. Biol. 1997. V. 274. P. 661–675.
9. Zav'yalov V., Denesyuk A. // Immunol. Lett. 1982. V. 4. P. 7–14.
10. Zav'yalov V., Denesyuk A., Zav'yalova G. // Immunol. Lett. 1989. V. 22. P. 173–182.
11. Zav'yalov V., Denesyuk A., Zav'yalova G. // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1041. P. 178–185.
12. Sprang S., Bazan J. // Curr. Opin. Struct. Biol. 1993. V. 3. P. 815–827.
13. Barasoain I., Portoles A., Aramburu J., Rojo J. // J. Immunol. 1989. V. 143. P. 507–512.
14. Kontsek P., Boresky L., Kontsekova E., Macicova I., Kolsunova A., Novak M., Krchnak V. // Mol. Immunol. 1991. V. 28. P. 1289–1297.
15. Kontsek P., Boresky L., Kontsekova E., Kolsunova A., Novak M., Zav'yalov V., Maiorov V. // Mol. Immunol. 1992. V. 29. P. 863–870.
16. Kontsek P., Boresky L., Zav'yalov V., Maiorov V. // Immunol. Lett. 1993. V. 35. P. 281–284.
17. Zav'yalov V., Navolotskaya E., Abramov V., Galaktionov V., Isaev I., Kaurov O., Kozhich A., Maiorov V., Prusakov A., Vasilenko R., Volodina E. // FEBS Lett. 1991. V. 78. P. 187–189.
18. Danilovich A., Freze K., Shevalier A., Samukov V., Kirkin A., Gusev M. // Immunol. Lett. 1992. V. 31. P. 15–20.
19. Zav'yalov V., Navolotskaya E., Vasilenko R., Abramov V., Volodina E., Roslovtseva O., Prusakov A., Kaurov O. // Mol. Immunol. 1995. V. 32. P. 425–431.
20. Danilovich A., Freze K., Romashkova J., Valujskikh A., Makarov E., Targoni O., Makarova N., Kushch A. // FEBS Lett. 1995. V. 369. P. 161–164.

21. Zav'yalov V., Vasilenko R., Dolgikh D., Kirpichnikov M., Navolotskaya E., Korpela T. // International Patent Application PCT/FI98/00418. 2000. Finnish Patent WO9852594. 2001.
22. Fish E.N. // J. Interferon Res. 1992. V. 12. P. 257–266.
23. Senda T., Saitoh S., Mitsui Y. // J. Mol. Biol. 1995. V. 253. P. 187–207.
24. Piehler J., Schreiber G. // J. Mol. Biol. 1999. V. 294. P. 223–237.
25. Mitsui Y., Senda T., Shimazu T., Matsuda S., Utsumi J. // Pharmac. Ther. 1993. V. 58. P. 93–132.
26. Uze G., Lutfalla G., Mogensen K. // J. Interferon Cytokine Res. 1995. V. 15. P. 3–26.
27. Fedorov A., Dolgikh D., Chemeris V., Chernov B., Finkelstain A., Schulga A., Alakhov Y., Kirpichnikov M., Ptitsyn O. // J. Mol. Biol. 1992. V. 225. P. 927–931.
28. Долгих Д., Габриэлян А., Наволоцкая Е., Чемерис В., Кирпичников М. // Биофизика. 1993. Т. 35. С. 67–74.
29. Aphsizheva I., Dolgikh D., Abdullaev Z., Uversky V., Kirpichnikov M., Ptitsyn O. // FEBS Lett. 1998. V. 425/1. P. 101–104.
30. Dolgikh D., Uversky V., Gabrielyan A., Chemeris V., Fedorov A., Navolotskaya E., Zav'yalov V., Kirpichnikov M. // Protein Engineering. 1996. V. 9. P. 195–201.
31. Bogdan C. // Curr. Opin. Immunol. 2000. V. 12. P. 419–424.
32. Akbar A., Lord J., Salmon M. // Immunol. Today. 2000. V. 21. P. 337–342.
33. Sinigaglia F., D'Ambrosio D., Panina-Bordignon P., Rogge L. // Immunol. Rev. 1999. V. 170. P. 65–72.
34. Santini S., Lapenta C., Logozzi M., Parlato S., Spada M., Di Puccio T., Belardelli F. // J. Exp. Med. 2000. V. 191. P. 1777–1788.
35. Ruuth K., Carlsson L., Hallberg B., Lundgren E. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001. V. 284. P. 583–586.
36. Ronnblom L., Alm G., Oberg K. // Ann. Intern. Med. 1991. V. 115. P. 178–183.
37. Ioannou Y., Isenberg D. // Arthritis Rheum. 2000. V. 43. P. 1431–1442.
38. Ronnblom L., Alm G. // J. Exp. Med. 2001. V. 194. P. F59–F63.
39. Черткова Р.В., Костянин И.А., Астапова М.В., Сурина Е.А., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. // Биорган. химия. 2003. Т. 29. С. 30–37.
40. Provencher S., Glocker J. // Biochemistry. 1981. V. 20. P. 33.
41. Еришов Ф. Система интерферона в норме и при патологии. М.: Медицина, 1996. С. 87–88.
42. Чижов Н., Еришов Ф., Индулен М. Основы экспериментальной химиотерапии вирусных инфекций. Рига: Зинатне, 1988. С. 52–55.
43. Day C., Schwartz B., Li B., Pestka S. // J. Interferon Res. 1992. V. 12. P. 139–143.
44. Hu R., Bekisz J., Hayes M., Audet S., Beeler J., Petricoin E., Zoon K. // J. Immunol. 1999. V. 163. P. 854–860.
45. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. P. 389–412.
46. Practical Protein Chemistry. A Handbook / Ed. A. Dabre. Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley and Sons Ltd., 1986. P. 300–302.
47. Laemmli U. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
48. Schagger H., Jagow G. // Analyt. Biochem. 1987. V. 166. P. 368–379.
49. Edman P., Henschen A. // Protein Sequence Determination / Ed. S.B. Needleman, 2 ed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1975. P. 232–279.

## Artificial Proteins with Antiviral Properties of $\alpha$ -Interferons

R. V. Chertkova\*#, Z. Kh. Abdullaev\*&, D. A. Dolgikh\*,  
V. P. Zav'yalov\*\*, and M. P. Kirpichnikov\*

# Phone: +7 (095) 335-2888, fax: +7 (095) 335-5033, e-mail: rita@nmr.ru

& Present address: National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health,  
Bethesda, Maryland, 20892 USA

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

\*\* Chair of Biomedicinal Biotechnologies, Russian University of Peoples Friendship, ul. Miklukho-Maklaya 6,  
GSP Moscow, 117198 Russia

Consensus sequence 30–36 LKDRHDF of human  $\alpha$ -interferons is inserted into the C- and N-terminal sequences of the artificial protein albeferon using genetic engineering methods in order to obtain artificial proteins with antiviral activity. Albeferon, obtained by Dolgikh *et al.* (*Protein Eng.*, 1996, vol. 9, pp. 195–201), already contains the IFN- $\alpha_2$  130–137 fragment and possesses antiproliferative activity comparable with that of IFN- $\alpha_2$ . According to CD spectroscopy, both proteins have regular secondary structures similar to that of the precursor protein. They exhibit antiviral activities, and the activity of one of them is comparable with that of IFN- $\alpha_2$ . At the same time, their cytotoxic properties are displayed only at relatively high concentrations, which substantially exceed the minimal antiviral concentrations. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

**Key words:** albebetin, albeferon,  $\alpha_2$ -interferon, antiviral activity, artificial proteins