



УДК 577.112.6.083.3 : 543.422.25

© 1991 г.

*Т. А. Балашова, В. С. Пашков, Л. В. Оноприенко,  
И. И. Михалева, Т. Ю. Мареева, Е. Э. Петрова,  
В. А. Несмеянов, В. Т. Иванов*

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ  $^1\text{H}$ -ЯМР ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ  
МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА К ИНТЕРЛЕЙКИНУ-2 ЧЕЛОВЕКА  
И ЕГО Fab-ФРАГМЕНТА С СИНТЕТИЧЕСКИМИ  
ПЕПТИДАМИ — ФРАГМЕНТАМИ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2**

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва*

Для девяти синтетических пептидов, соответствующих участку аминокислотной последовательности 59 — 78 интерлейкина-2 человека, проведено отнесение сигналов в спектрах водных растворов в свободном состоянии и в присутствии специфического моноклонального антитела ЛНКБ-2 или его Fab-фрагмента. Исследован перенос ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) с антитела (Fab-фрагмента) на сигналы протонов пептида в условиях, когда фракция пептида в связанном состоянии значительно меньше фракции пептида в свободном состоянии. Для получения спектров ЯЭО была модифицирована стандартная импульсная последовательность, что позволило устранить из спектров широкие сигналы и значительно увеличивать соотношение сигнал пептида/шум. Анализ ЯЭО на сигналах пептидов показал, что в комплексе с антителом (Fab-фрагментом) с поверхностью белка контактируют метильные группы остатков, соответствующих остаткам Leu<sup>66,70,72</sup>, Val<sup>69</sup> и Ala<sup>73</sup> интерлейкина-2 (IL-2), т. е. в данном случае природа взаимодействия антиген-антитело имеет гидрофобный характер. Минимальным фрагментом молекулы IL-2, сохраняющим способность связываться с антителом, является фрагмент -Leu<sup>70</sup>-Asn<sup>71</sup>-Leu<sup>72</sup>.

Взаимодействие антиген-антитело — один из ключевых процессов, протекающих при развитии иммунной реакции. Оно характеризуется высокой специфичностью и аффинностью. В последние годы достигнуты значительные успехи в понимании молекулярных основ взаимодействия антител с соответствующими антигенами, в том числе белковыми. Экспериментально показано, что прочность комплекса антигена с антителом обуславливается их комплементарностью, приводящей к множественным взаимодействиям за счет образования водородных связей, электростатических и гидрофобных взаимодействий. Эти данные были получены главным образом рентгеноструктурным анализом кристаллических комплексов Fab-фрагментов антител с гаптенами [1] и лизоцимом [2].

Наряду с методом рентгеноструктурного анализа для изучения взаимодействия антител с антигенами использовалась спектроскопия ЯМР — метод, позволяющий изучать локальное окружение и подвижность индивидуальных групп исследуемых молекул или комплексов молекул, т. е. получать информацию о молекулярных аспектах взаимодействия антиген-антитело в растворе. Этим методом были получены ценные сведения о взаимном расположении индивидуальных групп антигена и антитела в ряде комплексов антиген-антитело [3—14]. Однако исследование структуры иммунных комплексов методом спектроскопии ЯМР сопряжено с преодолением затруднений, связанных с высокой молекулярной массой этих объектов. Наличие в спектрах  $^1\text{H}$ -ЯМР большого числа сигналов,

В работе использованы стандартные сокращения, рекомендованные комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB, а также: HOBT — 1-гидроксibenзотриазол, IL-2 — интерлейкин-2, ONp — *n*-нитрофенил-оксид-, OPp — пентафторфенил-оксид-, TFA — трифторуксусная кислота, ЯЭО — ядерный эффект Оверхаузера.

уширенных за счет низкой молекулярной подвижности белковой молекулы, усложняет выделение сигналов индивидуальных групп. Широко используемый при определении пространственного строения небольших молекул ЯЭО, позволяющий идентифицировать пространственно сближенные группы, в случае больших молекул мало эффективен из-за высокой скорости спиновой диффузии [15, 16]. В макромолекулах ЯЭО быстро распространяется вдоль молекулы, теряя селективность, поэтому спектры ЯЭО, получаемые вычитанием спектров ЯМР с облучением радиочастотным полем какого-либо сигнала и без облучения, начинают отличаться от обычного спектра ЯМР только при очень коротких временах облучения.

Перечисленные выше трудности привели к разработке ряда методических подходов, в том числе весьма эффективных и сравнительно простых, основанных на наличии в исследуемой системе быстрого обмена низкомолекулярного лиганда между связанным с макромолекулой и свободным состояниями. В этих условиях сигналы свободного и связанного с макромолекулой лиганда сливаются в один общий сигнал. Ширина этого сигнала, химический сдвиг и другие параметры являются промежуточными между соответствующими параметрами лиганда в свободном и связанном с макромолекулой состояниях в отсутствие обмена. Например, для лиганда, быстро обменивающегося между свободным и связанным с макромолекулой состояниями, ширина сигнала какой-либо группы лиганда, наблюдаемой в спектре ЯМР,

$$v_{\text{набл}} = P_c v_c + P_k v_k,$$

где  $P_c$  и  $P_k$  — фракции лиганда в свободном и связанном состояниях,  $v_c$  и  $v_k$  — ширина сигнала соответствующей группы лиганда в свободном и связанном состояниях в отсутствие обмена. При существенном избытке свободного лиганда в спектре  $^1\text{H}$ -ЯМР на фоне широких сигналов макромолекулы появляются хорошо различимые в спектре более узкие сигналы лиганда, быстро обменивающегося между свободным и связанным с макромолекулой состояниями. Ядерный эффект Оверхаузера, перенесенный с протонов макромолекулы на протоны лиганда в комплексе макромолекула—лиганд, при диссоциации комплекса переносится на сигналы свободного лиганда, где как бы накапливается, если скорость обмена лиганда превышает скорость релаксации лиганда в свободном состоянии. Наличие избытка свободного лиганда снижает скорость передачи ЯЭО с макромолекулы на сигналы лиганда, и при достаточно большом избытке свободного лиганда в спектрах ЯЭО становится возможно изучать скорость передачи ЯЭО на сигналы лиганда, зависящую как от длительности приложения радиочастотного поля к сигналам макромолекулы, так и от степени удаленности протонов лиганда от протонов макромолекулы в комплексе макромолекула—лиганд [3—6, 16—19].

В данной работе ЯЭО на сигналах лиганда, возникающий в результате облучения радиочастотным полем сигналов макромолекулы, был использован для детального изучения взаимодействия моноклонального антитела к интерлейкину-2 (IL-2), одному из центральных регуляторов иммунной системы человека [20], с синтетическими пептидными фрагментами IL-2.

Среди полученных ранее моноклональных антител к рекомбинантному IL-2 было обнаружено антитело ЛНКВ-2, связывающееся с фрагментом 59—72 последовательности IL-2 [21, 22], которое было использовано в настоящей работе.

Цель работы — идентификация групп пептида, контактирующих с антителом в комплексах пептид-антитело или пептид—Fab-фрагмент, а также выявление минимального по размерам пептида, сохраняющего способность к связыванию с антителом. Для достижения поставленной в настоящей работе цели синтезированы девять пептидов, являющихся фрагментами (или их производными) центральной части молекулы IL-2 человека:

(- Leu<sup>59</sup>GluGluGluLeuLysProLeuGluGluValLeuAsnLeuAlaGlnSerLysAsnPhe<sup>78</sup>-)

(I) LeuGluGluGluLeuLysPro

(II) Ac-LeuLysProLeuGluGluValLeuAsnLeu-OCH<sub>3</sub>

(III) Ac-LeuGluGluValLeuAsnLeu

(IV) Ac-GluValLeuAsnLeu-OCH<sub>3</sub>

(V) GluValLeuAsnLeu-OCH<sub>3</sub>

(VI) ValLeuAsnLeuAlaGlnSer

(VII) Ac-AlaGlnSerLysAsnPhe-OCH<sub>3</sub>

(VIII) LeuAsnLeu-OCH<sub>3</sub>

(IX) AsnLeu-OCH<sub>3</sub>

Пептиды (I)—(IX) были получены методами классического пептидного синтеза в растворе: конденсацией предварительно синтезированных защищенных пептидных фрагментов (соединение (II)) или последовательным удлинением аминокислотной цепи с С-конца (соединения (III)—(IX)).

Пептид (I) приготовлен деблокированием ранее описанного, полностью защищенного гептапептида Boc-Leu-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Leu-Lys(Z)-Pro [22]. Соединение (II) синтезировано в результате конденсации защищенных фрагментов по схеме (3+7), последующего удаления защитных групп боковых функций и N<sup>α</sup>-ацетилирования. Пептид (III) получен путем деблокирования N<sup>α</sup>-ацетилирования соответствующего защищенного гептапептида, описанного в работе [22]. Пептиды (IV), (V), (VIII) и (X) приготовлены аналогично из промежуточных пептидов, полученных при синтезе соединения (II). Пептиды (VI) и (VII) синтезированы в соответствии со схемами 1 и 2. Методические приемы, использованные при их получении, аналогичны описанным ранее для синтеза серии пептидов — фрагментов центрального участка IL-2 человека [22].

*Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР синтетических пептидов, антитела и его Fab-фрагмента.* В растворах H<sub>2</sub>O сигналы от пептидных протонов NH имеют константы спин-спинового взаимодействия <sup>3</sup>J (NH-C<sup>α</sup>H) в интервале 6—8 Гц, что согласуется с отсутствием упорядоченной структуры у пептидов (II)—(VII) [23]. Отнесение сигналов протонов к конкретным группам в первичной структуре проведено на основании сопоставления мультиплетности и химических сдвигов сигналов изученных пептидов как между собой, так и с литературными данными для конформационно лабильных пептидов [24], а также результатов анализа фазоизбирательных 2D-спектров <sup>1</sup>H-ЯМР COSY, DQF-COSY\*.

В спектрах <sup>1</sup>H-ЯМР Fab-фрагмента антитела в присутствии пептида (II) на фоне широких сигналов макромолекулы появляются (рис. 1а) сигналы пептида, которые при низкой его концентрации заметны лишь в разностном спектре, получаемом вычитанием из спектра <sup>1</sup>H-ЯМР Fab-фрагмента с пептидом спектра <sup>1</sup>H-ЯМР Fab-фрагмента (рис. 1а). С повышением концентрации пептида его сигналы увеличиваются по интенсивности, сужаются и становятся хорошо заметными на фоне широких сигналов Fab-фрагмента (рис. 1б); их химические сдвиги изменяются, приближаясь к значениям химических сдвигов, характерных для свободного пептида (ср. рис. 1б), что также было использовано для отнесения сигналов пептида в присутствии белка. Подобные изменения наблюдались и в спектрах <sup>1</sup>H-ЯМР пептидов (III)—(VI) в присутствии антитела. Следует отметить также появление в спектрах NOESY в растворах пептидов (II)—(VI), содержащих антитело или его Fab-фрагмент, кросс-пиков между протонами пептида. Эти кросс-пики, не наблюдавшиеся в отсутст-

\* DQF-COSY — спектр COSY, накопленный с использованием двухквантового фильтра.

СХЕМА 1

Синтез гептапептида (VI) последовательности 69-75 IL-2 человека

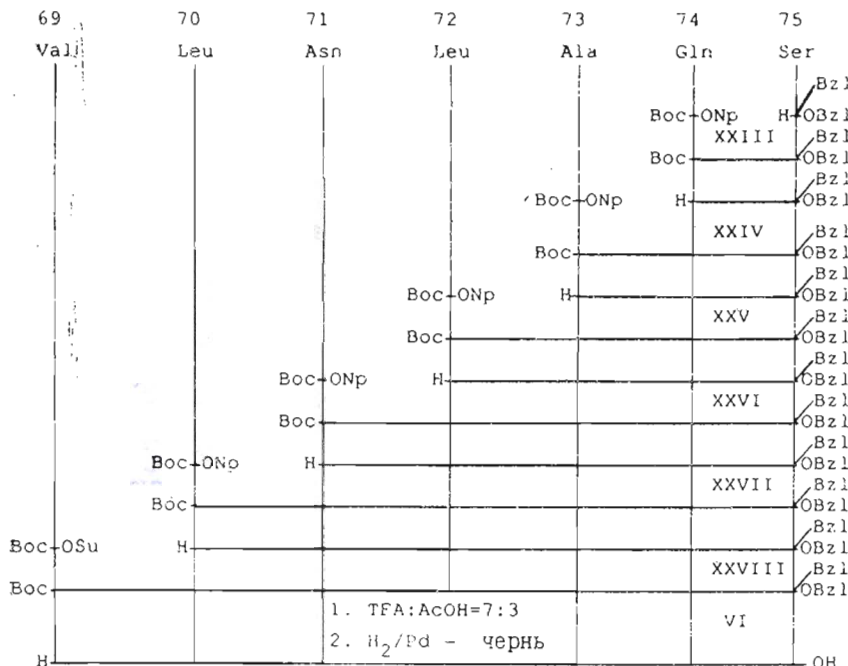
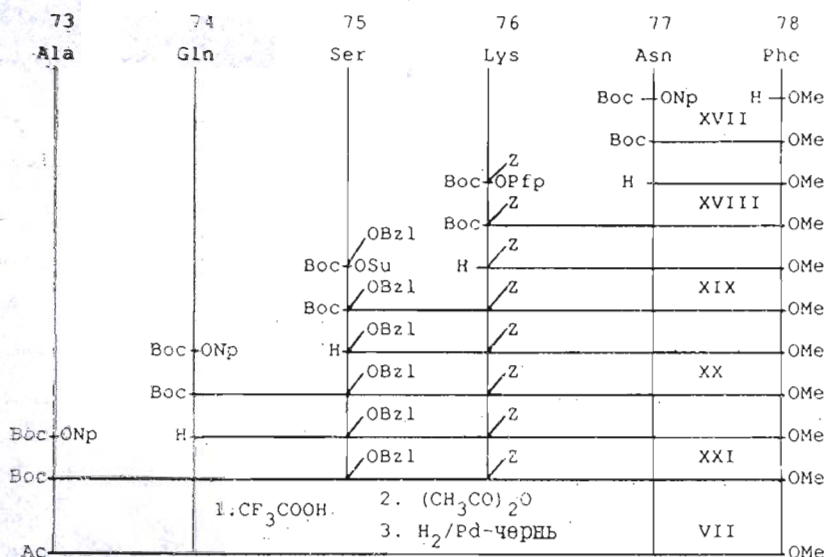


СХЕМА 2

Синтез гексапептида (VII) последовательности 73-78 IL-2 человека



вие белка, в ряде случаев оказались полезными для отнесения сигналов пептида к конкретным группам в первичной структуре. Значения химических сдвигов сигналов протонов пептидов в смесях пептида с антителом или его Fab-фрагментом, использованных в данной работе для съемки спектров ЯЭО, приведены в табл. 1.

Изменение химических сдвигов и уширение сигналов пептида, зависящие от соотношения концентраций белок/пептид, а также появление в спектрах NOESY кросс-пиков между протонами пептида позволяют

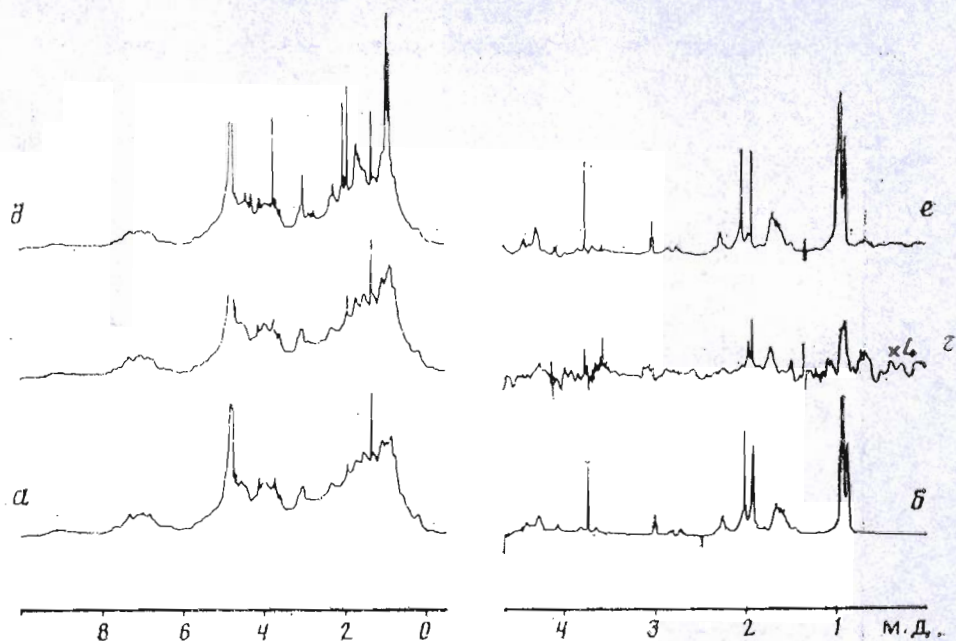


Рис. 1. Спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР 0,5 мМ Fab-фрагмента антитела (а), 8,5 мМ пептида (II) (б), смеси пептида (II) с Fab-фрагментом при мольных соотношениях пептид — Fab-фрагмент 1,6 : 1 (в) и 7 : 1 (д). Разностные спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР (е) и (е) получены вычитанием спектра (а) из спектров (в) и (д) соответственно.  $\times 4$  — четырехкратное увеличение амплитуды спектра

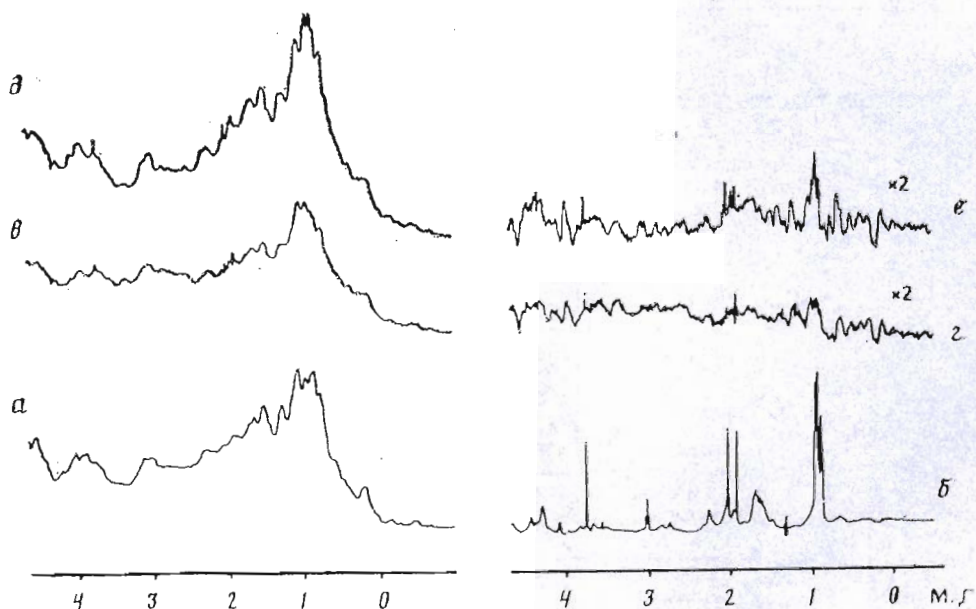


Рис. 2. Спектры ЯЭО 0,5 мМ Fab-фрагмента антитела (а), смеси пептида (II) с Fab-фрагментом (мольное соотношение пептид — Fab-фрагмент 7 : 1) при  $t_1$  0,1 (б) и 1 с (в). Разностные спектры ЯЭО (з) и (е) получены вычитанием из спектров (б) и (в) соответственно спектров ЯЭО Fab-фрагмента антитела, полученных при аналогичных значениях  $t_1$  в отсутствие пептида. Для получения спектров ЯЭО использована импульсная последовательность 2 (см. «Экспер. часть»). Разностный спектр (б) получен вычитанием из спектра  $^1\text{H}$ -ЯМР смеси пептид (II) — Fab-фрагмент (7 : 1) спектра  $^1\text{H}$ -ЯМР Fab-фрагмента.  $\times 2$  — двукратное увеличение амплитуды спектра

сделать два вывода: 1) пептид связывается с белком; 2) обмен пептида между свободным и связанным с белком состояниями протекает с достаточно высокой скоростью, позволяющей надеяться на возможность использования ЯЭО для идентификации протонов пептида, контактирующих

Химические сдвиги ( $\delta$ , м.д.) протонов пептидов (II)–(VI), (VIII), (IX)  
в их смесях с антителом (Fab-фрагментом)

	$C^{\alpha}H$	$C^{\beta}H$	$C^{\gamma}H$	$C^{\delta}H$	$C^{\epsilon}H$	$OCH_3$	$COCH_3$	
Пептид (II)								
Leu <sup>1</sup>	4,27	1,69	1,64	0,90; 0,94	3,01		2,02	
Lys <sup>2</sup>	4,65	1,73; 1,81	1,47	1,70				
Pro <sup>3</sup>	4,27	2,02; 2,05	1,68; 1,72	3,66; 3,83				
Leu <sup>4</sup>	4,30	1,58; 1,62	1,69	0,92; 0,96				
Glu <sup>5,6</sup>	4,41	1,92	2,32					
	4,30	1,95; 2,05	2,25					
Val <sup>7</sup>	4,07	2,09	0,93; 0,96	0,87; 0,94				
Leu <sup>8</sup>	4,43	1,68	1,64					
Asn <sup>9</sup>	4,72	2,72; 2,83						
Leu <sup>10</sup>	4,35	1,57; 1,67	1,59	0,87; 0,94				3,67
Пептид (III)								
Leu <sup>1</sup>	4,31	1,61	1,65	0,91; 0,95			2,02	
Glu <sup>2</sup>	4,29	1,93; 2,04	2,25					
Glu <sup>3</sup>	4,29	1,93; 2,04	2,25					
Val <sup>4</sup>	4,10	2,09	0,93; 0,96	0,87; 0,94				
Leu <sup>5</sup>	4,40	1,65	1,61					
Asn <sup>6</sup>	4,74	2,70; 2,82						
Leu <sup>7</sup>	4,18	1,59	1,60	0,88; 0,92				
Пептид (IV)								
Glu <sup>1</sup>	4,39	2,01; 1,93	2,27			3,77	2,05	
Val <sup>2</sup>	4,13	2,09	0,95; 0,97					
Leu <sup>3</sup>	4,46	1,68	1,58					0,90; 0,95
Asn <sup>4</sup>	4,7	2,74; 2,84						
Leu <sup>5</sup>	4,28	1,69	1,63					0,88; 0,95
Пептид (V)								
Glu <sup>1</sup>	4,12	2,13	<b>2,46</b>	0,93; <b>0,95</b>		3,72		
Val <sup>2</sup>	4,13	2,09	<b>1,58</b>					0,86; 0,91
Leu <sup>3</sup>	4,42	1,65	<b>1,58</b>					0,86; 0,91
Asn <sup>4</sup>	4,7	2,70; 2,79						
Leu <sup>5</sup>	4,39	1,62	<b>1,58</b>					0,86; 0,91
Пептид (VI)								
Val <sup>1</sup>	4,36	<b>2,18</b>	0,99; 1,01	0,92; 0,98				
Leu <sup>2</sup>	4,41	1,62	1,61					
Asn <sup>3</sup>	4,7	2,73; 2,84						
Leu <sup>4</sup>	4,36	1,66	1,62					0,92; 0,98
Ala <sup>5</sup>	4,36	1,41						
Gln <sup>6</sup>	4,41	2,11; 2,19	2,39					
Ser <sup>7</sup>	4,30	3,86						
Пептид (VIII)								
Leu <sup>1</sup>	4,06	1,77	1,70	0,99; 1,01		3,79		
Asn <sup>2</sup>	4,87	2,79; 2,88		0,92; 0,97				
Leu <sup>3</sup>	4,48	1,72	1,66					
Пептид (IX)								
Asn <sup>1</sup>	4,15	2,82; 2,90	1,75	0,96; 1,00		3,81		
Leu <sup>2</sup>	4,39	1,79						

с поверхностью белка в комплексе пептид—белок. Появление в спектрах NOESY кросс-пиков на сигналах протонов лиганда характерно для систем, в которых константы диссоциации комплекса находятся в интервале  $10^{-5}$  —  $10^{-3}$  М [25]. При таких значениях констант диссоциации и использованных в настоящей работе концентрациях смесей пептид/антитело или пептид/Fab-фрагмент свыше 80% мест связывания на белке должно быть занято пептидом.

Систематическому исследованию переноса ЯЭО с протонов макромолекулы на сигналы протонов лиганда предшествовало изучение влияния частоты облучения насыщающего поля на вызываемый этим полем ЯЭО. Спектры ЯЭО, полученные при насыщении радиочастотным полем сигналов ароматических протонов (7,1 м.д.) и  $^{13}\text{C}$ -протонов (5,2 м.д.) макромолекулы, оказались идентичными. Поэтому в дальнейшем для получения спектров межмолекулярного ЯЭО радиочастотным полем облучались протоны макромолекулы с сигналами при 7,1 м.д., так как в этой области отсутствуют сигналы протонов исследованных пептидов. Исключение составил лишь пептид (VII), содержащий ароматические протоны фенилаланина: в случае этого пептида радиочастотным полем насыщали протоны с сигналами при 5,2 м.д.

Высокая скорость передачи ЯЭО в макромолекуле и более медленный его перенос на сигналы свободного пептида обуславливает наличие в спектре ЯЭО смеси Fab-фрагмента с пептидом (II) интенсивных сигналов протонов белка, тогда как сигналы ЯЭО протонов пептида малы и едва заметны на фоне сигналов Fab-фрагмента (рис. 2в, д). Интенсивность сигналов ЯЭО белка при времени облучения  $t_1$  1 и 2 с (см. импульсную последовательность 2 в «Экспериментальной части») составляла соответственно 80 и 100% от интенсивности сигналов белка в спектре  $^1\text{H}$ -ЯМР, а интенсивность сигналов ЯЭО пептида не достигала и 15% от интенсивности пептидных сигналов в спектре  $^1\text{H}$ -ЯМР. Следует отметить, что с удлинением времени облучения интенсивность сигналов пептида в спектре ЯЭО возрастает, но терется селективность ЯЭО. Поэтому для подразделения протонов пептида по степени контакта с макромолекулой необходимо использовать времена облучения, значительно меньшие 1—2 с. Однако в этих условиях в спектрах ЯЭО интенсивность сигналов пептида снижается значительно быстрее интенсивности сигналов белка, что существенно осложняет регистрацию и измерение интенсивности сигналов ЯЭО пептида. В подобных ситуациях в ряде работ успешно использовались разностные спектры ЯЭО [4—6, 8—14], к которым прибегли и мы. Вычитанием полученных в одинаковых условиях спектров ЯЭО смеси пептид (II)/Fab-фрагмент и Fab-фрагмента были получены разностные спектры ЯЭО (см. рис. 2г, е). Однако и в этих разностных спектрах при  $t_1 < 1$  с выделение сигналов ЯЭО пептида становилось затруднительным из-за низкого соотношения сигнал/шум.

Выход был найден в модификации импульсной последовательности 2, обычно используемой для исследования межмолекулярного ЯЭО [3, 4]. Основная особенность этой новой импульсной последовательности — введение дополнительной задержки между окончанием неселективного 90-градусного радиочастотного импульса и началом регистрации спада сигнала свободной индукции (AQ). В период этой задержки быстро релаксирующие широкие сигналы белка значительно уменьшаются по интенсивности, тогда как медленно релаксирующие узкие сигналы пептида уменьшаются незначительно. Серия регулярно повторяемых неселективных 180-градусных радиочастотных импульсов, прикладываемых к исследуемой системе в период этой задержки, уменьшает эффект неоднородности магнитного поля в объеме образца и препятствует появлению фазовых искажений сигналов в период введенной нами задержки.

Использование импульсной последовательности 3 позволило значительно (в 4—6 раз) усилить регистрируемый спектрометром сигнал спада свободной индукции и, следовательно, повысить точность его преобразования в цифровую форму при занесении сигнала в память компьютера. Это в конечном итоге способствовало существенному увеличению соот-

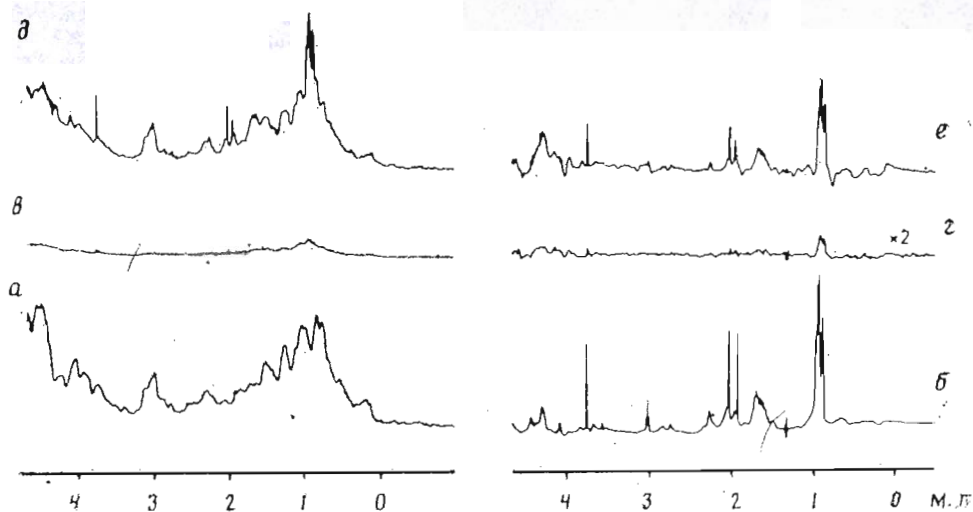


Рис. 3. Спектры ЯЭО смеси Fab-фрагмента с пептидом (II) (см. подпись к рис. 2), полученные с использованием импульсной последовательности 3 (см. «Экспер. часть»).

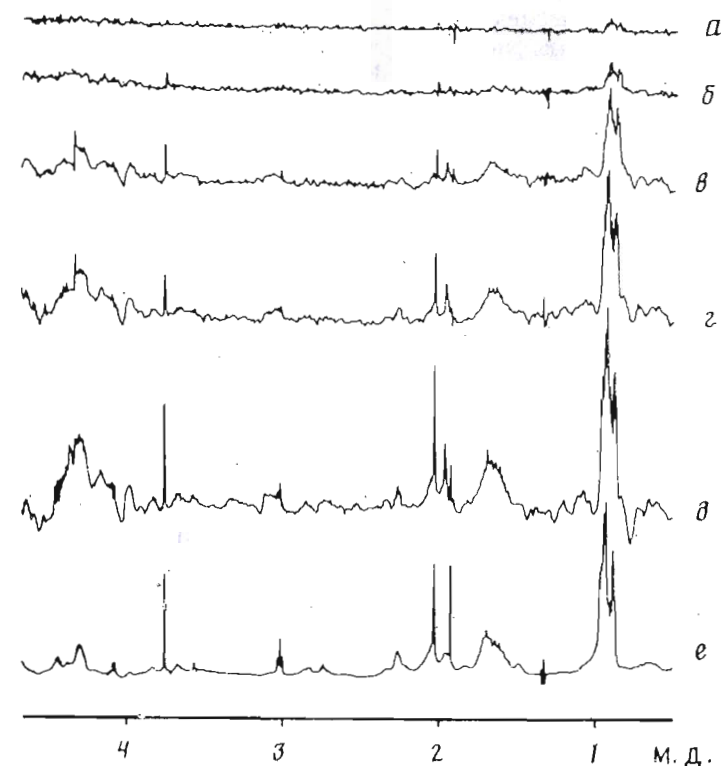


Рис. 4. Разностные спектры ЯЭО смеси пептид (II) — Fab-фрагмент (7 : 1) при временах  $t_1$  0,05 (а), 0,1 (б), 0,3 (в), 0,5 (г), 1,5 с (д), полученные с применением импульсной последовательности 3. Разностный спектр (е) получен вычитанием из спектра  $^1\text{H}$ -ЯМР смеси пептида (II) (3,5 мМ) с Fab-фрагментом (0,5 мМ) спектра  $^1\text{H}$ -ЯМР Fab-фрагмента (0,5 мМ)

ношения сигнал пептида/шум в спектрах ЯЭО и дало возможность в разностных спектрах ЯЭО оценить интенсивность сигналов синтетических пептидов при малых временах  $t_1$  (см. рис. 2г, е, 3г, е).

Разностные спектры ЯЭО, полученные вычитанием спектров ЯЭО образцов, содержащих пептид (II) с Fab-фрагментом и без него при различных временах  $t_1$  (рис. 4) показывают, что по мере роста  $t_1$  в разностных спектрах ЯЭО появляется все большее число сигналов пептида. С ростом  $t_1$  интенсивность сигналов пептида увеличивается вплоть до значе-



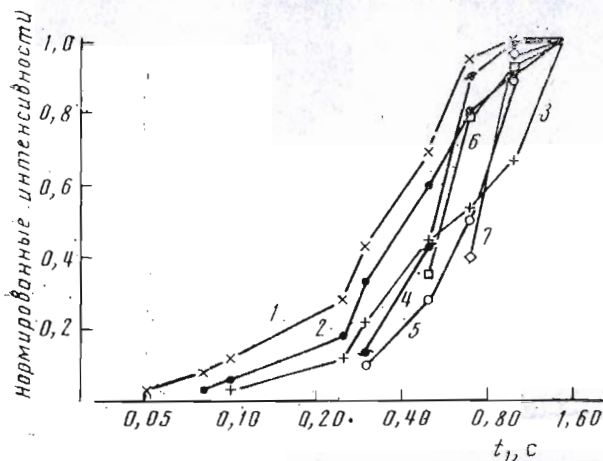


Рис. 5. Зависимости нормированных (см. текст) интенсивностей сигналов пептида от  $t_1$  (отложено по оси абсцисс в логарифмическом масштабе) в разностных спектрах ЯЭО смеси пептида (II) и Fab-фрагмента антитела (мольное соотношение 7 : 1). 1 — суммарный сигнал  $\text{CH}_3$ -групп остатков валина и лейцинов, 2 — сигнал группы  $-\text{OCH}_3$ , 3 — сигнал группы  $-\text{CO}-\text{CH}_3$ , 4 — сигнал  $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ -группы остатков глутаминовой кислоты, 5 — сигнал  $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ -группы остатка лизина, 6 — сигнал  $\text{C}^\delta\text{H}_2$ -группы остатка пролина, 7 — сигнал  $\text{C}^\beta\text{H}_2$ -группы остатка аспарагина

ний  $t_1$  0,5—1,5 с, после чего рост интенсивности начинает быстро замедляться и интенсивность сигналов пептида достигает своего максимального значения. В исследованном нами образце интенсивность сигналов пептида в разностном спектре ЯЭО при времени насыщения протонов белка  $t_1$  1,5 с составила: 12% —  $\text{CH}_3$ -группы остатков Val и Leu, 10% —  $\text{C}^\beta\text{H}_2$ ,  $\text{C}^\gamma\text{H}_2$  Leu и  $\text{C}^\beta\text{H}_2$  Pro, 6% —  $\text{C}^\beta\text{H}_2$  Glu, 4% —  $\text{C}^\beta\text{H}_2$  Asn, 4% —  $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$  Lys, 6% —  $\text{C}^\delta\text{H}_2$  Pro, 6% — метилы  $\text{OCH}_3$ - и  $\text{COCH}_3$ -групп, 12% — область  $\text{C}^\alpha\text{H}$  (% от интенсивности сигналов соответствующих групп в спектре  $^1\text{H}$ -ЯМР этого же образца). Не углубляясь в количественный анализ интенсивностей сигналов в разностных спектрах ЯЭО, сопряженный с учетом многих, пока неизвестных параметров исследуемой системы (времена релаксации протонов, пространственное строение и динамика взаимодействия Fab-фрагмента и пептида), мы ограничились качественным анализом полученных данных. Интенсивности сигналов пептида в разностном спектре ЯЭО при  $t_1 < 1,5$  с были разделены на интенсивности соответствующих сигналов пептида при  $t_1$  1,5 с, после чего были построены графики зависимости нормированных интенсивностей сигналов пептида (II) от  $t_1$  (рис. 5).

При коротких  $t_1$  ЯЭО распространяется по молекуле белка, не затрагивая протонов пептида. При  $t_1 \geq 50$  мс в разностных спектрах ЯЭО начинают появляться и увеличиваться по интенсивности сигналы пептидных протонов (см. рис. 4а). Первыми появляются сигналы метильных групп остатков Leu и Val, при  $t_1$  80 и 100 мс — сигналы ЯЭО метоксильной и ацетиловой групп. Сигналы ЯЭО  $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$  Lys и  $\text{C}^\gamma\text{H}_2$  Glu, а также  $\text{C}^\beta\text{H}_2$  Asn и  $\text{C}^\delta\text{H}_2$  Pro становятся заметными лишь при  $t_1$  300 и 500 мс соответственно. Длительное время задержки, необходимое для появления сигналов лиганда в спектрах ЯЭО, свидетельствует об отсутствии непосредственного контакта соответствующих групп лиганда с макромолекулой в образованном ими комплексе [16, 18]. Дифференцированное по времени  $t_1$  появление сигналов пептида (II) в разностных спектрах ЯЭО наглядно показывает ход линий (рис. 5): у протонов, не контактирующих с поверхностью белка в комплексе, линии начинаются далеко от начала координат и затем круто поднимаются вверх, тогда как у протонов, контактирующих с поверхностью белка, линии начинаются значительно ближе к началу координат. Перечисленные выше данные свидетельствуют, что в комплексе (Fab-фрагмент—пептид (II)) пептид (II) контактирует с поверхностью Fab-фрагмента боковыми цепями остатков Leu<sup>1,4,8,10</sup> и Val<sup>7</sup>, а также  $\text{CH}_3$ -группами метоксила и ацетила. Протоны боковых цепей остатков Lys<sup>2</sup>, Glu<sup>5,6</sup>, содержащих ионогенные группы, и остатка Asn<sup>9</sup> не участвуют во взаимодействии с поверхностью белка.

Для устранения неоднозначности идентификации контактирующих с белком участков пептида (II), вызванной перекрыванием сигналов пеп-

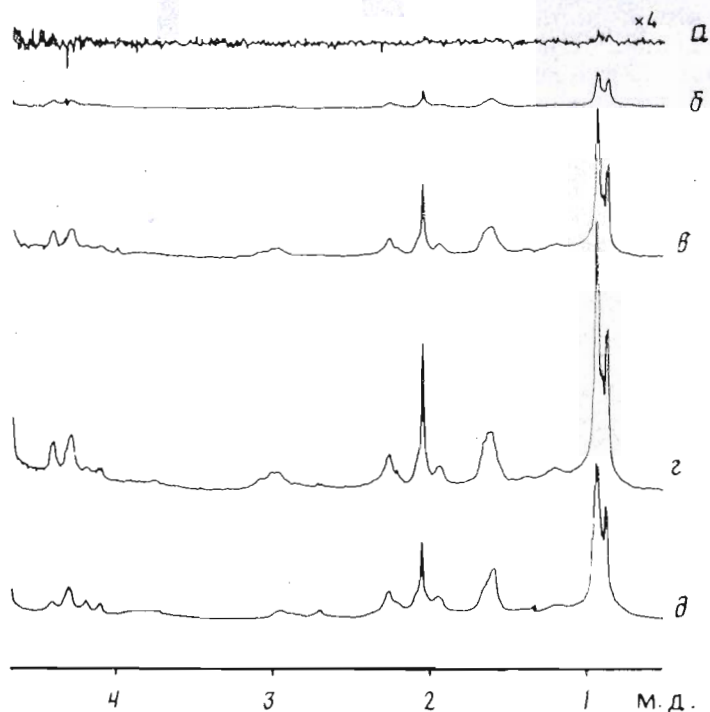


Рис. 6. Спектры ЯЭО смеси пептид (III) — антитело (35 : 1), полученные при временах  $t_1$  0,01 (а), 0,10 (б), 0,40 (в), 1,00 с (г) с использованием импульсной последовательности З. д — спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР этой смеси пептида (III) с антителом.  $\times 4$  — четырехкратное увеличение амплитуды спектра

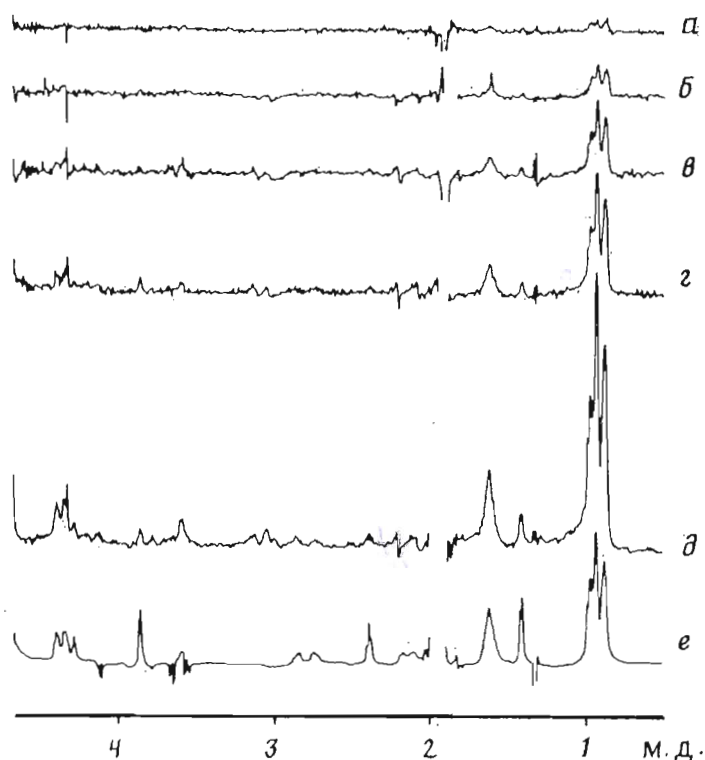


Рис. 7. Разностные спектры ЯЭО смеси пептид (VI) — антитело (15 : 1), полученные при временах  $t_1$  0,05 (а), 0,10 (б), 0,20 (в), 0,30 (г), 1,00 с (д) с использованием импульсной последовательности З. е — разностный спектр, полученный вычитанием из спектра  $^1\text{H}$ -ЯМР этой смеси спектра  $^1\text{H}$ -ЯМР антитела

тида в спектрах, было изучено взаимодействие с антителом более коротких, чем пептид (II), пептидов (III)—(V).

Предварительные исследования спектров смеси пептид (III)—антитело показали значительно большее влияние обменного процесса на сигналы пептида (III) по сравнению с эффектами, наблюдавшимися в смеси пептид (II)—Fab-фрагмент. В спектрах ЯЭО, например, интенсивность сигналов пептида (III) была настолько высока, что отпала необходимость получения разностных спектров ЯЭО. При больших временах  $t_1$  интенсивность сигналов ЯЭО пептида в этих спектрах достигает 25—30% от интенсивности сигналов самого пептида в спектре  $^1\text{H}$ -ЯМР (рис. 6). В сравнении с пептидом (II) дифференциация времени задержки появления сигналов пептида (III) в спектрах ЯЭО уменьшается. Это, однако, не препятствует проявлению тех же тенденций, которые наблюдались при взаимодействии пептида (II) с Fab-фрагментом антитела: при  $t_1$  10 мс в спектре ЯЭО появляются сигналы метильных групп остатков  $\text{Leu}^{1,5,7}$ ,  $\text{Val}^4$  и группы  $\text{COCH}_3$ ; при  $t_1$  80—100 мс —  $\text{C}^\beta$ ,  $^2\text{H}_2$ -групп  $\text{Glu}^{2,3}$ ; при  $t_1$  300—400 мс  $\text{C}^\beta$ ,  $^2\text{H}_2$ -группы  $\text{Asn}^6$  (см. рис. 6a — e).

Пептид (IV) отличается от пептида (V) наличием ацетильной группы на N-конце. В сравнении с пептидом (III) N-концевая часть пептидов (IV) и (V) укорочена на два аминокислотных остатка, а C-концы, как и у пептида (II), защищены метоксильной группой. Одно из этих структурных различий (возможно, введение метоксильной группы) или оба вместе повлияли на обменный процесс и существенно снизили эффективность передачи ЯЭО на сигналы пептидов (IV) и (V) в сравнении с тем, что наблюдалось в спектрах ЯЭО смеси антитела и пептида (III). В случае смесей пептидов (IV) или (V) с антителом для анализа ЯЭО на сигналах пептидов вновь пришлось прибегнуть к разностным спектрам ЯЭО. В ходе анализа были обнаружены те же тенденции скорости появления в спектрах ЯЭО сигналов пептидов, которые наблюдались в случае более длинных пептидов (II) и (III), включая поведение метоксильных и ацетильной (в пептиде (IV)) групп. Появление сигналов этих групп при относительно коротких  $t_1$  свидетельствует о контакте протонов метоксильных и ацетильной групп пептидов с поверхностью белковой молекулы в комплексе пептид-белок.

Согласно приведенным выше данным, C-концевые метоксильные группы пептидов (II), (IV) и (V) в их комплексах с белком контактируют с поверхностью белка. В аминокислотной последовательности IL-2 в этом месте находится остаток  $\text{Ala}^{73}$ , который, по-видимому, также должен контактировать с поверхностью белка в комплексе пептид—антитело. Для проверки этого предположения был синтезирован пептид (VI), удлинённый в сторону C-конца последовательности IL-2 человека.

В разностных спектрах ЯЭО пептида (VI) в присутствии антитела (см. рис. 7a—d) сигналы метильных групп остатков  $\text{Val}^1$ ,  $\text{Leu}^4$  и  $\text{Ala}^5$  появлялись при  $t_1$  50 мс, тогда как сигналы от протонов  $\text{C}^\beta$ ,  $^2\text{H}_2$   $\text{Asn}^3$ ,  $\text{C}^\beta$ ,  $^2\text{H}_2$   $\text{Ser}^7$  и  $\text{C}^\gamma$ ,  $^2\text{H}_2$   $\text{Gln}^6$  появлялись при 300, 100 и 200 мс соответственно. Следовательно, в контакте с антителом участвуют метильные группы остатков  $\text{Val}^1$ ,  $\text{Leu}^2$ ,  $\text{Leu}^4$  и  $\text{Ala}^5$ .

Данные, полученные нами при исследовании взаимодействия пептидов (II)—(VI) с антителом и Fab-фрагментом этого моноклонального антитела, позволяют идентифицировать участки пептида, контактирующие с поверхностью белка в комплексе и, по-видимому, обеспечивающие связывание пептида. Чтобы проверить наши предположения и установить минимальный по размерам пептид, сохраняющий способность связываться с антителом, было исследовано взаимодействие с антителом пептидов (I), (VII) — (IX). Отличительная особенность пептидов (I) и (VII) в исследуемой серии пептидов (I)—(IX) — их соответствие участкам аминокислотной последовательности IL-2, сдвинутым в N- и C-концевую области.

В спектрах  $^1\text{H}$ -ЯМР пептидов (I) и (VII) не наблюдалось изменений ширины сигналов и химических сдвигов сигналов пептида от соотношения концентраций пептид—белок, подобных тем, которые наблюдались для

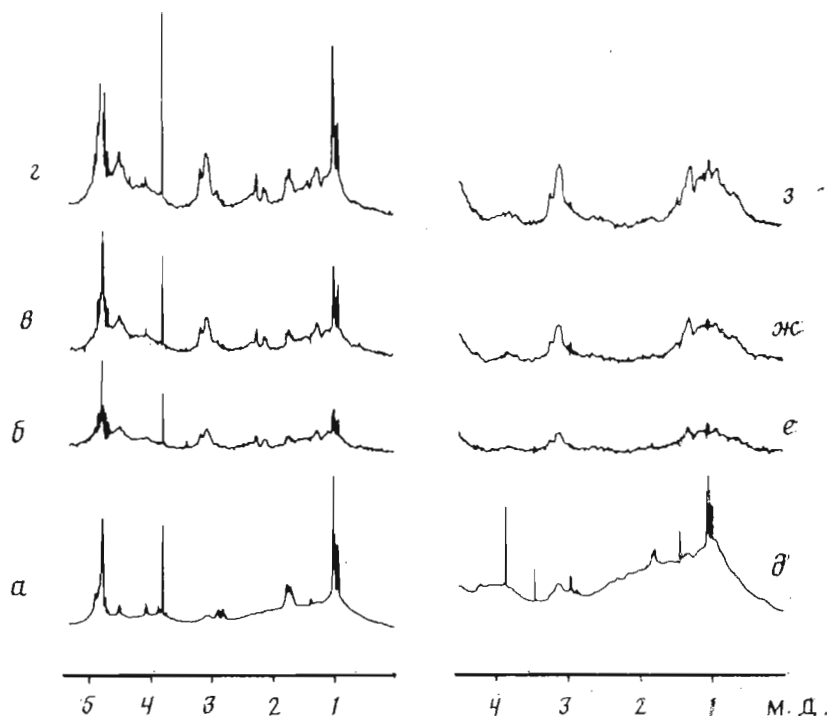


Рис. 8.  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектры смесей пептид (VIII) — антитело (23 : 1) (а) и пептид (IX) — антитело (10 : 1) (д). Выше приведены спектры ЯЭО этих смесей, полученные при временах  $t_1$  0,3 (б, е), 0,5 (в, ж), 1,0 с (г, з) с помощью импульсной последовательности З

пептидов (II)–(VI). В разностных спектрах ЯЭО растворов, содержащих эти пептиды и антитело, сигналы пептидов не проявлялись. Следовательно, пептиды (I) и (VII), отвечающие пептидным фрагментам 59–65 и 73–78 аминокислотной последовательности IL-2, не образуют комплексов с антителом.

Сигналы ЯЭО пептида (VIII), увеличивающиеся по мере увеличения длительности  $t_1$ , хорошо заметны в спектрах, тогда как сигналы пептида (IX) в спектрах ЯЭО не проявляются на фоне увеличивающихся (с удлинением  $t_1$ ) сигналов антитела (рис. 8б—г, е—з). Такое поведение сигналов протонов пептидов в спектрах ЯЭО наглядно свидетельствует о связывании с антителом пептида (VIII) и об отсутствии связывания с антителом пептида (IX).

Первичная структура исследованных пептидов моделирует участки полипептидной цепи молекулы IL-2, что позволяет провести обобщение полученных в данной работе результатов, используя первичную структуру IL-2. Природа взаимодействия антиген—антитело в исследованной антигенной области IL-2 имеет ярко выраженный гидрофобный характер, и комплекс антиген—антитело образуется за счет контакта с поверхностью антитела изопропильных групп остатков Leu<sup>66,70,72</sup>, Val<sup>69</sup> и метильной группы остатка Ala<sup>73</sup>. Фрагмент полипептидной цепи — Leu<sup>70</sup>-Asn<sup>71</sup>-Leu<sup>72</sup> является минимальным фрагментом молекулы IL-2, сохраняющим способность связываться с антителом. Конформации пептидов в комплексе с антителом и аминокислотные остатки антитела, участвующие в связывании с антигеном, предстоит выяснить в процессе будущих исследований.

### Экспериментальная часть

В работе использовано моноклональное антитело IgG-1-класса, полученное к рекомбинантному IL-2 человека. Для получения препаративных количеств моноклонального антитела гибридные клетки ЛНKB-2 [21] наращивались в культуре и вводились внутривенно мышам BALB/c

## Константы полученных соединений

Соединение	Т. пл., °С	Выход, %	$[\alpha]_D$ (с в TFE) * — в H <sub>2</sub> O	$R_f$ (система)
I	Аморфное	79	-51,8(2,0)	0,28(Ж); 0,43(Д)
II	»	74	-44,99(1,68)	0,41(Ж); 0,38(Д)
III	»	61	-45,00(0,20) *	0,33(Ж); 0,25(Д)
IV	»	75	-68,96(0,11) *	0,44(Ж); 0,39(Д)
V	»	71	-68,96(0,14)	0,48(Ж); 0,43(Д)
VI	»	63	-158,41(0,10) *	0,45(Ж); 0,34(Д)
VII	»	58	-27,33(0,12)	0,57(Ж); 0,46(Д)
VIII	»	88	-15,68(0,10)	0,25(Ж); 0,77(Д)
IX	»	90	-5,35(0,11)	0,23(Ж); 0,71(Д)
X	161-162	91	-21,02(1,05)	0,75(Б); 0,45(А)
XI	184-185	63	-36,62(1,17)	0,66(Б); 0,37(А)
XII	>250	90	-40,11(1,32)	0,63(Б); 0,32(А)
XIII	>250	65	-39,81(1,20)	0,74(Б); 0,35(А)
XIV	>250	82	-38,64(1,11)	0,65(Б); 0,33(А)
XV	>250	69	-42,11(1,25)	0,60(Б); 0,31(А)
XVI	>250	67	-14,56(0,57)	0,42(Б); 0,20(В)
XVII	144-146	89	-5,43(7,6)	0,44(З); 0,56(В)
XVIII	160-163	94	-7,31(8,2)	0,35(Б); 0,69(В)
XIX	195-197	55	-9,30(8,6)	0,38(Б); 0,67(В)
XX	218-221	95	-15,38(8,8)	0,09(Б); 0,58(В)
XXI	230-240, разл.	58	-19,99(2,4)	0,07(Б); 0,53(В)
XXII	Масло	67	-51,00(1,00)	0,67(Б); 0,45(В)
XXIII	193-195	87	-15,90(8,8)	0,52(Б); 0,67(В)
XXIV	184-186	62	-35,48(8,7)	0,49(Б); 0,72(В)
XXV	186-190	76	-60,00(8,0)	0,46(Б); 0,83(В)
XXVI	245-255, разл.	95	-64,00(10)	0,10(Б); 0,52(В)
XXVII	>250	98	-58,69(9,2)	0,15(Б); 0,59(В)
XXVIII	>250	82	-64,51(9,3)	0,80(И); 0,61(В)

*Примечание.* Для тонкослойной хроматографии использовали хроматографические системы: этилацетат — этанол, 10 : 1 (А); хлороформ — этилацетат — этанол — уксусная кислота, 9 : 3 : 2 : 1 (Б); хлороформ — трифторэтанол — уксусная кислота, 50 : 10 : 1 (В); толуол — уксусная кислота, 7 : 3 (Г); изопропанол — вода, 2 : 1 (Д); *n*-бутанол — муравьиная кислота — вода, 75 : 15 : 10 (Е); *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 12 : 3 : 5 (Ж); хлороформ — этилацетат, 4 : 1 (З); хлороформ — трифторэтанол — уксусная кислота, 5 : 1 : 1 (И).

(из расчета  $(1-5) \cdot 10^6$  клеток на мышь), которые за 14 сут до этого получили инъекцию 0,5 мл пристана (2,4,10,14-тетраметилпентадекана, Sigma, США). Через 10—20 сут у мышей с хорошо выраженной опухолью проводили отбор асцитной жидкости, клетки осаждали центрифугированием (200 g, 10 мин), суспендировали в бессывороточной среде и вводили новому хозяину. Асцитную жидкость, содержащую антитело, осветляли центрифугированием (600 g, 10 мин), разделяли на небольшие порции и хранили при  $-70^\circ\text{C}$  или подвергали очистке.

Очистку моноклонального антитела ЛНКБ-2 из асцитной жидкости проводили по методике [26] путем осаждения загрязняющих белков каприловой кислотой с последующей сорбцией остаточных примесей на DEAE-целлюлозе DE 52 (Whatman, Великобритания). Асцитную жидкость разбавляли двумя объемами 0,06 М ацетатного буфера (рН 4,0), доводили рН смеси до 4,8, а затем при непрерывном перемешивании по каплям добавляли каприловую кислоту из расчета 67 мкл на 1 мл асцита. Смесь перемешивали 30 мин при  $18^\circ\text{C}$ , после чего денатурированные белки осаждали центрифугированием (10 000 g, 30 мин). Надосадочную жидкость диализовали 18 ч против 50 объемов 0,015 М ацетатного буфера, рН 5,7, при  $4^\circ\text{C}$ . К отдиализованному препарату добавляли DEAE-целлюлозу, уравновешенную тем же буфером из расчета 0,12 г целлюлозы на 1 мл исходного асцита, и перемешивали 30 мин при  $18^\circ\text{C}$ . DEAE-целлюлозу отделяли центрифугированием (200 g, 10 мин), а надосадочную жидкость, содержащую антитело, концентрировали ультрафильтрацией. Активность полученного препарата антитела оценивали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа [24], а гомогенность — с помощью SDS-электрофореза в 10% полиакриламидном геле [27]. Fab-фрагмент этого антитела был получен и очищен по методике [28].

В работе использованы аминокислоты и их производные фирм Reanal (Венгрия), Serva (ФРГ). ТСХ осуществляли на пластинках с закрепленным слоем силикагеля фирмы Merck (ФРГ) в хроматографических системах, приведенных в табл. 2. Для колоночной хроматографии использовали силикагель L 40/100 мкм и силасорб 600 LC 200 мкм (Сhemapol, ЧСФР), сефадексы LH-20 и LH-60, G-15 (Pharmacia, Швеция), TSK-гель Toyopearl HW-40 (Toyosoda, Япония). В качестве детектирующих приборов использовали Uvicord II, Uvicord SD (ЛКВ, Швеция). Удельное вращение измеряли на поляриметре Jasko DIP-360 (Jasko, Япония). Температуру плавления определяли на приборе Boetius (ГДР), все приведенные точки плавления не исправлены. Количественный аминокислотный анализ осуществляли на приборе D-500 (Durrum, США), гидролиз пептидов проводили стандартным образом (6 н. HCl, 24 ч, 110° С).

1. *Leu-Glu-Glu-Glu-Leu-Lys-Pro* (I). К раствору 30 мг (0,022 ммоль) Ac-Leu-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Leu-Lys(Z)-Pro-OMe [22] в трифторэтанол добавили 82 мкл (0,88 ммоль) 1,4-циклогексадиена, 20 мкл HCOOH, Pd-чернь. Реакционную смесь перемешивали 4 ч при 25° С, катализатор отфильтровали, фильтрат упарили, остаток промыли эфиром, высушили под вакуумом, хроматографировали на колонке (2,5 × 50 см) с LH-20 в EtOH—H<sub>2</sub>O—AcOH (25 : 25 : 1). Выход гептапептида (I) 15 мг (79%).

2. *Voc-Asn-Leu-OMe* (X). К раствору 10 г (0,055 моль) HCl·Leu-OMe в 20 мл DMF добавили 6 мл (0,055 моль) N-метилморфолина, 20 г (0,057 моль) Voc-Asn-ONp и 7 г (0,055 моль) HOBT. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 25° С, упарили до объема 6 мл и разбавили 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> до 1 л. Выцапший осадок отфильтровали, промыли на фильтре 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3 × 200 мл), водой, насыщенным NaHCO<sub>3</sub> (4 × 150 мл), водой, высушили в вакууме и промыли 50 мл смеси эфир — метанол (5 : 1) и 100 мл этанола. Выход дипептида (X) 18 г (91%).

17 г (0,047 моль) дипептида (X) выдержали 1,5 ч при 25° С в смеси TFA — AcOH (7 : 3), упарили, кристаллизовали из гексана и эфира. Выход дипептида (IX) 16 г (90%).

Пептиды Voc-Leu-Asn-Leu-OMe (XI), H-Leu-Asn-Leu-OMe (VIII), Voc-Val-Leu-Asn-Leu-OMe (XII), Voc-Glu(OBzl)-Val-Leu-Asn-Leu-OMe (XIII), Voc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Val-Leu-Asn-Leu-OMe (XIV), Voc-Leu-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Val-Leu-Asn-Leu-OMe (XV) получали в условиях, приведенных выше для соединений (IX) и (X). Их выходы и константы приведены в табл. 2.

3. *Voc-Leu-Lys(Z)-Pro-Leu-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Val-Leu-Asn-Leu-OMe* (XVI). 50 мг (0,045 ммоль) Voc-Leu-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Val-Leu-Asn-Leu-OMe деблокировали как описано в опыте 1. Выход гексапептида (XVa) количественный. К раствору 52 мг (0,088 ммоль) Voc-Leu-Lys(Z)-Pro (XXII) в 100 мкл DMF добавили 12 мг (0,089 ммоль) HOBT, охладили до -10° С и добавили при перемешивании охлажденный до 0° С раствор 36 мг (0,086 ммоль) *n*-толуолсульфоната N-циклогексил-N'-(морфолиноэтил)-карбодимида. Реакционную смесь перемешивали 30 мин при 0° С, добавили 51 мг (0,045 ммоль) гексапептида (XVa) и 5 мкл (0,045 ммоль) N-метилморфолина, перемешивали 30 мин при 0° С и 48 ч при 25° С, хроматографировали на колонке (2,5 × 45 см) с LH-60 в 10% AcOH в DMF. Выход декапептида (XVI) 47 мг (67%).

4. *Ac-Leu-Lys(Z)-Pro-Leu-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Val-Leu-Asn-Leu-OMe* (XVIa). 45 мг (0,027 ммоль) декапептида (XVI) деблокировали как описано в опыте 2, растворили в 200 мкл трифторэтанола, добавили 6 мкл (0,054 ммоль) N-метилморфолина и 25 мкл (0,27 ммоль) (CH<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O, выдержали 15 мин при 25° С. Трифторэтанол упарили, остаток промыли водой (3 × 10 мл), высушили в вакууме. Выход декапептида (XVIa) количественный.

5. *Ac-Leu-Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu-OMe* (II). К раствору 45 мг (0,027 ммоль) декапептида (XVIa) в трифторэтанол добавили 50 мкл муравьиной кислоты, 76 мкл (0,81 ммоль) 1,4-циклогексадиена и свежеприготовленную Pd-чернь. Гидрировали 2 ч при 25° С, катализатор от-

## Данные аминокислотных анализов

Соединение	Asp	Glu	Leu	Lys	Pro	Val	Ser	Phe	Ala
I		3,12	2,09	1,00	0,98				
II	1,01	2,01	4,12	1,06	1,11	0,99			
III	1,00	2,11	3,10			0,99			
IV	1,00	1,08	2,11						
V	1,01	1,05	2,09						
VI	1,00	1,01	2,03			1,00	1,02		1,00
VII	1,00			0,99			1,04	1,00	1,00
VIII	1,02		2,04						
IX	0,97		1,00						
X	0,98		1,00						
XI	1,00		2,10						
XII	1,00		2,20			0,99			
XIII	0,98	1,20	2,10			0,99			
XIV	1,00	2,30	2,00			1,00			
XV	0,98	2,20	2,10			1,01			
XVI	1,11	2,10	3,99	0,98	1,02	1,03			
XVII	1,08							1,00	
XVIII	1,06			1,10				0,99	
XIX	1,04			1,05			1,11	1,01	
XX	1,07	1,09		1,00			1,09	1,03	
XXI	1,04			1,09			1,08	1,00	1,00
XXII			1,00	1,20	1,02				
XXIII		1,09					1,06		
XXIV		1,11					1,05		1,00
XXV		1,07	1,03				1,04		1,00
XXVI	0,98	1,05	1,02				1,02		1,00
XXVII	0,99	1,08	2,04				1,04		1,00
XXVIII	0,97	1,06	2,07			0,99	1,04		1,00

фильтровали, фильтрат упарили, остаток растворили в 10% AcOH и хроматографировали на колонке (2,5 × 30 см) с LH-60 в смеси растворителей EtOH—H<sub>2</sub>O—AcOH (1 : 1 : 0,1). Выход декапептида (II) 24 мг (74%).

6. *Woc-Asn-Phe-OMe* (XVII). К раствору 7,1 г (0,02 моль) *Woc-Asn-ONp*, 2,7 г (0,02 моль) *HOBT*, 6,4 г (0,03 моль) *HCl·Phe-OMe* в 10 мл DMF прибавили 3,3 мл (0,03 моль) *N*-метилморфолина. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 25° С, разбавили 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> до объема 1 л. Выпавший осадок промыли, как описано в опыте 1, высушили в вакууме. Выход дипептида (XVII) 7,0 г (89%).

Раствор 4,7 г (0,012 моль) дипептида (XVII) в 20 мл TFA — AcOH (7 : 3) выдержали 40 мин при 25° С, упарили. Остаток кристаллизовали из этилацетата с гексаном, промыли водой, высушили в вакууме. Выход дипептида (XVIIa) 97%.

Пептиды (XVIII), (XIX), (XX), (XXI) получали аналогично по схеме 2. Их выходы и константы приведены в табл. 2.

Гексапептид *Ac-Ala-Gln-Ser(Bzl)-Lys(Z)-Asn-Phe-OMe* (XXIa) получали как описано в опыте 3. Гидрогенолиз осуществляли как в опыте 4.

7. *Woc-Gln-Ser(Bzl)-OBzl* (XXIII). К раствору 16 г (0,04 моль) TFA·*Ser(Bzl)-OBzl* в 20 мл смеси диоксан — DMF (1 : 1) прибавили 4,4 мл (0,04 моль) *N*-метилморфолина, 16,6 г (0,045 моль) *Woc-Gln-ONp* и 6,7 г (0,05 моль) *HOBT*. Реакцию вели и обрабатывали как в опыте 5, промыли этилацетатом. Выход трипептида (XXIII) 17,9 г (87%).

Пептиды (XXIV), (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII) получали аналогично дипептиду (XXIII). Выходы и константы полученных пептидов приведены в табл. 2.

Конечные продукты (I)—(IX) были очищены гель-фильтрацией на колонках с G-15 и LH-20.

Индивидуальность и чистота конечных и защищенных пептидов контролировались ТСХ на пластинках с закрепленным слоем силикагеля (Mесгk, ФРГ), аминокислотным анализом (на приборе Durrum, США, см. табл. 2, 3) и <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопией.

ЯМР. Спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР (500 МГц) снимали на спектрометре WM 500 (Bruker, ФРГ) в режиме квадратурного детектирования спада сигнала свободной индукции. Несущая частота радиочастотных импульсов совпадала с частотой сигнала HDO, интервал детектируемых частот составлял  $\pm 4000$  Гц от несущей частоты радиочастотного импульса. Время регистрации спада сигнала свободной индукции  $AQ = 0,82$  и  $0,52$  с. Перевод зарегистрированных спектров из временной области в частотную осуществлялся преобразованием Фурье. С целью улучшения соотношения сигнал/шум в ряде случаев данные перед преобразованием Фурье умножались на экспоненциальную функцию, приводившую к уширению линии сигнала на половине высоты на 3 Гц. Химические сдвиги измеряли относительно сигнала HDO, химический сдвиг которого при  $30^\circ\text{C}$  составляет 4,75 м. д. от DSS (2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфоната натрия).

Для обмена лабильных протонов 10 мг антитела или Fab-фрагмента антитела в фосфатном 0,01 М буфере (pH 6,9—7,4, 0,15 М NaCl и 0,015 М  $\text{NaN}_3$ ) диализовали (двукратно) относительно 40—50-кратного избытка  $^2\text{H}_2\text{O}$  (98%  $^2\text{H}$ , «Изотоп», СССР) с тем же буфером и составом солей в течение нескольких часов при  $18^\circ\text{C}$ , а затем в течение 2—3 сут при  $10$ — $12^\circ\text{C}$ , лиофилизовали и растворяли в 0,4 мл  $^2\text{H}_2\text{O}$  (100%  $^2\text{H}$ , SIC, США). Пептиды, добавляемые к растворам антитела или его Fab-фрагмента, также были предварительно лиофилизированы из  $^2\text{H}_2\text{O}$ .

Спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР и ЯЭО получены с помощью импульсных последовательностей:

$$(t_3 - 90^\circ - AQ)_n \quad (1)$$

$$[t_3 - t_{1(F1, F2)} - t_2 - 90^\circ - AQ_{(-, +)}]_n, \quad (2)$$

$$[t_3 - t_{1(F1, F2)} - t_2 - 90^\circ - (t_4 - 180^\circ - t_3)_{16} AQ_{(-, +)}]_n, \quad (3)$$

где  $t_3 = 3$  с — время восстановления равновесного состояния системы ядерных спинов;  $t_1$  — время включения радиочастотного поля ( $\gamma\text{H}_2 = 45$  Гц) для облучения сигналов протонов белка частотой F1 или свободного от сигналов участка спектра частотой F2 (F1 прилагается при 7,2 или 5,2 м. д.; F2 — при 12,5 м. д.);  $t_2 = 2$  мс — пауза для приведения к равновесному состоянию электронной системы спектрометра после удаления радиочастотного поля  $\gamma\text{H}_2$ ;  $t_4 = 600$  мкс;  $AQ = 0,52$  с — время регистрации спада сигнала свободной индукции; (—, +) — знаки вычитания (в случае F1) или суммирования (в случае F2) полученного в импульсной последовательности спада сигнала свободной индукции при занесении в память компьютера;  $n = 64$ — $4096$  — число повторений импульсной последовательности с целью увеличения соотношения сигнал/шум в результирующем спектре.

Фазоизбирательные 2D-спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР COSY, DQF-COSY, NOESY получены с использованием рекомендаций и микропрограмм, прилагаемых фирмой Bruker к стандартной программе DISR87.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Davies D. R., Metzger H. // Ann. Rev. Immunol. 1983. V. 1. P. 87—117.
2. Alzari P. M., Lascombe M.-B., Polyak R. J. // Ann. Rev. Immunol. 1988. V. 6. P. 555—580.
3. Gronenborn A. M., Clore G. M., Brunori M., Giardina B., Falcioni G., Perutz M. F. // J. Mol. Biol. 1984. V. 178. № 3. P. 731—742.
4. Ferrin L. J., Mildvan A. S. // Biochemistry. 1985. V. 24. № 24. P. 6904—6913.
5. Anglister J., Bond M. W., Frey T., Leahy D., Levitt M., McConnell H. M., Rule G. S., Tomasello J., Whittaker M. // Biochemistry. 1987. V. 26. № 19. P. 6058—6064.
6. Anglister J., Jakob Ch., Assulin O., Ast G., Pinker R., Arnon R. // Biochemistry. 1988. V. 27. № 2. P. 717—724.
7. Frey T., Anglister J., McConnell H. M. // Biochemistry. 1988. V. 27. № 14. P. 5161—5165.
8. Anglister J., Levy R., Scherf T. // Biochemistry. 1989. V. 28. № 8. P. 3360—3365.
9. Levy R., Assulin O., Scherf T., Levitt M., Anglister J. // Biochemistry. 1989. V. 28. № 18. P. 7168—7175.
10. Anglister J., Zilber B. // Biochemistry. 1990. V. 29. № 4. P. 921—928.



11. Kotani S., Kawai G., Yokoyama Sh., Murofushi H. // *Biochemistry*. 1990. V. 29. № 43. P. 10049—10054.
12. Balaram P., Bothner-By A. A., Dadok J. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1972. V. 94. № 11. P. 4015—4017.
13. James T. L., Cohn M. // *J. Biol. Chem.* 1974. V. 249. № 8. P. 2599—2604.
14. James T. L. // *Biochemistry*. 1976. V. 15. № 21. P. 4724—4730.
15. Noggle J. H., Schirmer R. E. *The Nuclear Overhauser Effect*. N. Y.: Acad. Press, 1971.
16. Wuthrich K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. N.Y.: J. Wiley Int. Publ., 1986.
17. Clore G. M., Gronenborn A. M. // *J. Magn. Reson.* 1982. V. 48. № 3. P. 402—417.
18. Clore G. M., Gronenborn A. M. // *J. Magn. Reson.* 1983. V. 53. № 3. P. 423—442.
19. Ito W., Nishimura M., Sakato N., Fujio H., Arata Y. // *J. Biochem.* 1987. V. 102. P. 643—649.
20. Gillis S. // *J. Clin. Immunol.* 1983. V. 3. № 1. P. 1—21.
21. Lunev V. E., Lukin Yu. V., Kazennykh N. V., Belyaev S. V., Zubov V. P., Nesmeyanov V. A. // *Biomed. Sci.* 1990. V. 1. P. 68—72.
22. Оноприенко Л. В., Михалева И. И., Лунев В. Е., Несмеянов В. А., Иванов В. Т. // *Биоорган. химия*. 1989. Т. 15. № 7. P. 908—921.
23. Bystrov V. F. // *Progr. NMR Spectroscopy*. 1976. V. 10. № 2. P. 41—81.
24. Bundi A., Wuthrich K. // *Biopolymers*. 1979. V. 18. № 2. P. 285—297.
25. Clore G. M., Gronenborn A. M., Greipel J., Maass G. // *J. Mol. Biol.* 1986. V. 187. P. 119—124.
26. Steinbuch M., Audran R. // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1969. V. 134. P. 279—284.
27. Laemmli U. K. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680—685.
28. Parham P. // *Immunochemistry*. In *Handbook of Experimental Immunology*. V. 1 / Ed. Weir D. M. Oxford: Blackwell Sci. Publ., 1986. Ch. 14.

Поступила в редакцию  
24.IV.1991

T. A. BALASHOVA, V. S. PASHKOV, L. V. ONOPRIENKO, I. I. MIKHALEVA,  
T. Yu. MAREEVA, E. E. PETROVA, V. A. NESMEYANOV, V. T. IVANOV

### <sup>1</sup>H NMR STUDY OF THE COMPLEXES FORMED BY MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST HUMAN INTERLEUKIN-2 AND SYNTHETIC PEPTIDES

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of  
Sciences of the USSR, Moscow*

Proton signals for nine synthetic peptide fragments of human interleukin-2 (region 59—78) were assigned for aqueous solutions both of pure peptides and their mixtures with LNKB-2 monoclonal antibody. The nonspecific magnetization transfer (NOE) between the antibody or its Fab-fragment and the peptides was studied upon large excess of free peptide over bound peptide. NOE spectra using modified pulse sequence, enabling to eliminate broad signals and achieve higher (peptide signal)/noise ratio were obtained. The saturation transfer experiments indicated that methyl groups of amino acid residues corresponding to Leu<sup>66,70,72</sup>, Val<sup>69</sup> and Ala<sup>73</sup> in interleukin-2 contact with the antibody binding site. Thus, the hydrophobic interactions are of major importance for the LNKB-2-IL-2 peptide complexes. The minimal IL-2 fragment which can still bind to LNKB-2 monoclonal antibody is -Leu<sup>70</sup>-Asn<sup>71</sup>-Leu<sup>72</sup>.