



УДК 577.112.083.3:548.737

## ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА Fab-ФРАГМЕНТА МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА К ИНТЕРЛЕЙКИНУ-2 ЧЕЛОВЕКА В ДВУХ КРИСТАЛЛИЧЕСКИХ ФОРМАХ ПРИ РАЗРЕШЕНИИ 2.2 И 2.9 Å

© 2000 г. А. В. Фокин, П. В. Афонин, И. Ю. Михайлова, И. Н. Цыганник, Т. Ю. Мареева,  
В. А. Несмеянов, В. Пэнгборн\*, Н. Ли\*, В. Дюэкс\*, Е. Сижак\*\*, В. З. Плетнев<sup>#</sup>

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

\* Медицинский исследовательский институт им. Хаунтмана-Вудвард, Буффало, США;

\*\* НАСА, Центр космических полетов им. Маршалла, Хантсвилл, США

Поступила в редакцию 18.02.2000 г. Принята к печати 28.02.2000 г.

Рентгеновским методом молекулярного замещения установлена пространственная структура антигенсвязывающего фрагмента моноклонального антитела к интерлейкину-2 человека в двух кристаллических формах при разрешении 2.2 и 2.9 Å. Проведен анализ пространственной организации белка и стереохимии антигенсвязывающего центра.

*Ключевые слова:* моноклональные антитела, антигенсвязывающий фрагмент; интерлейкин-2; рентгеноструктурный анализ.

### ВВЕДЕНИЕ

Моноклональные антитела (МА) являются представителями большого класса гликопротеинов иммуноглобулинового суперсемейства. Они находят широкое применение в научных исследованиях и биотехнологии, что обусловлено их уникальной специфичностью к антигену.

Основная цель настоящего исследования – изучение структурных аспектов взаимодействия антиген–антитело. В качестве объекта исследования выбран Fab-фрагмент ( $M \sim 48$  кДа, 439 а. о.) МА LNKB-2 к интерлейкину-2 (IL-2) человека [1]. IL-2 относится к семейству цитокинов, отвечает за рост и дифференцировку Т- и В-лимфоцитов [2] и является одним из главных регуляторов иммунной системы. IL-2 рассматривается как перспективное терапевтическое средство при вторичных иммунодефицитах. МА LNKB-2, относящееся к классу IgG1, взаимодействует с IL-2 с высокой аффинностью, характеризующейся величиной константы связывания  $\sim 3 \times 10^8$  M<sup>-1</sup> [1]. Эпитоп антитела располагается в пептидном фрагменте 59–72 молекулы IL-2 [1, 3].

В данной работе представлены результаты рентгеноструктурного исследования пространственной организации свободного Fab-фрагмента МА LNKB-2 (Fab-LNKB-2) в двух кристаллических формах при разрешении 2.2 и 2.9 Å.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Кристаллическая упаковка.** Молекулы Fab-LNKB-2 с характерными размерами  $\sim 40 \times 50 \times 70$  Å занимают около 50% объема кристаллической ячейки. Кристаллическая упаковка характеризуется отсутствием развитой поверхности межмолекулярных взаимодействий. Каждая молекула в обеих кристаллических формах связана с десятью партнерами ближайшего окружения ограниченным числом рассредоточенных по поверхности межмолекулярных взаимодействий.

Водородные связи образуют 10 и 16 пар остатков ( $d < 3.5$  Å), солевые мостики – 6 и 6 пар ( $d < 4.0$  Å), ван-дер-ваальсовы контакты формируют 66 и 64 пары ( $d < 3.85$  Å) остатков в первой и второй кристаллических формах соответственно.

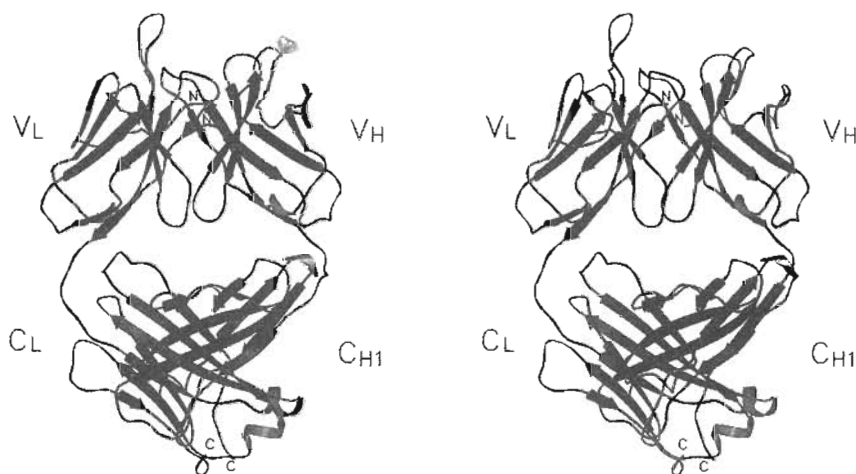
**Пространственная организация.** Структуры кристаллических форм 1 и 2 Fab-LNKB-2, установленные соответственно при разрешении 2.2 и 2.9 Å, как и следовало ожидать, оказались практически идентичными; относительное среднеквадратичное отклонение атомов основной цепи для них составило 0.48 Å. В этой связи, дальнейшее описание пространственной организации исследуемого объекта будет дано применительно только к одной форме 1.

Fab-LNKB-2 имеет характерную для Fab-фрагментов структуру, сформированную из двух цепей, легкой (L) и части тяжелой (H), уложенных в четыре структурных домена, два переменных ( $V_L$  и  $V_H$ ) и два константных ( $C_L$  и  $C_{H1}$ , рис. 1, 2). Архитектура белка имеет стандартную для Fab-фраг-

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 330-75-10; e-mail: pletnev@tek.siocb.ras.ru).

L1	L10	L20	L27 $abcde$	L40	L50		
<b>V<sub>L</sub>:</b> DVQMTQTPLTLSVTIGQPASISCESSQSLLYSNGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVP							
L60	L70	L80	L90	L100			
<b>V<sub>L</sub>:</b> DRFTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLVVYCVQGTHFPRTFFGGGKLEIKRA							
L110	L120	L130	L140	L150	L160	L170	
<b>C<sub>L</sub>:</b> DAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSTY							
L180	L190	L200	L210				
<b>C<sub>L</sub>:</b> SMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKSTSTSPIVKSFNRNEC							
H1	H10	H20	H30	H35 $a$	H40	H50	H60
<b>V<sub>H</sub>:</b> GVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGTGYSITSDYAWNWIHQFPGNKLEWMGYITYSGSTGYNPSL							
H70	H82 $abc$	H90	H100 $a$	H110			
<b>V<sub>H</sub>:</b> KSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCASYYDDYTWFTYWGQGTLVTVSA							
H120	H130	H140	H150	H165	H180		
<b>C<sub>H1</sub>:</b> AKTTPPSVFPLAPGSAQAQNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTVNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTL							
H190	H200	H210	H220	H230			
<b>C<sub>H1</sub>:</b> SSSVTVPPSSPRPSETVTCNVANPASSTKVDKKIVPRDC							

**Рис. 1.** Аминокислотная последовательность переменных ( $V_L$ ,  $V_H$ ) [4] и константных ( $C_L$ ,  $C_{H1}$ ) [5] доменов соответственно легкой (L) и тяжелой (H) цепей Fab-LNKB-2 с нумерацией остатков по номенклатуре Кэбата [5]. Последняя цифра номера расположена над остатком, отвечающим данному номеру. Малыми буквами помечены индексы остатков, сохраняющих предыдущий номер.



**Рис. 2.** Стереорепрезентация пространственной структуры Fab-LNKB-2. Индексами  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  и  $C_{H1}$  обозначены соответственно переменные и константные домены легкой (L) и тяжелой (H) цепей.

ментов  $\beta$ -структурную организацию, дополненную пятью короткими спиральными участками. Структура стабилизирована четырьмя внутрицепочечными и одной межцепочечной дисульфидными связями между консервативными остатками цистеина – L23–L88, L134–L194, H22–H92, H142–H208, L214–H230 (здесь и далее символы L и H обозначают принадлежность аминокислотных остатков к легкой и тяжелой цепям соответственно) и характеризуется наличием шести *цис*-пептидных связей, предшествующих остаткам пролина

L8, L95, L141, H149, H151, H202. Конформационные состояния почти всех остатков, описываемые торсионными углами основной цепи  $\phi$  и  $\psi$ , отвечают разрешенным областям карты Рамачандрана (см. “Эксперимент. часть”). Исключение составляет остаток Val L51 ( $\phi = 74^\circ$ ,  $\psi = -48^\circ$ ) с углами, располагающимися в запрещенной области правого нижнего квадранта конформационной карты, характерными для двойных  $\beta$ -изгибов типа I $\Pi'$  [6]. В молекуле Fab-LNKB-2 этот структурный тип реализуется в гиперварибель-



**Таблица 1.** Стабилизирующие взаимодействия в области интерфейса между переменными доменами Fab-LNKB-2\*

Остаток (V <sub>L</sub> )	ИК, %	Остаток (V <sub>H</sub> )	ИК, %	ВДВ $d < 3.85 \text{ \AA}$
S43 (C <sup>β</sup> )	46	Y91 (C <sup>ε1</sup> )	81	3.43
P44 (C <sup>ε1</sup> )	93	Y91 (C <sup>ζ</sup> )	81	3.85
R46 (C <sup>ζ</sup> )	13	T101 (C <sup>β</sup> )	0	3.78
R46 (C <sup>ζ</sup> )	13	T101 (C <sup>δ2</sup> )	0	3.85
Y49 (C <sup>ε2</sup> )	90	T99 (C)	5	3.83
L50 (C <sup>δ1</sup> )	7	Y98 (C <sup>α</sup> )	20	3.80
Y87 (C <sup>ε1</sup> )	84	L45 (C <sup>δ1</sup> )	97	3.80
Y87 (C <sup>ε2</sup> )	84	L45 (C <sup>δ1</sup> )	97	3.73
Y87 (C <sup>δ2</sup> )	84	L45 (C <sup>δ1</sup> )	97	3.80
Y87 (C <sup>ζ</sup> )	84	L45 (C <sup>δ1</sup> )	97	3.72
F94 (C <sup>ε2</sup> )	6	W47 (C <sup>η2</sup> )	93	3.52
F94 (C <sup>ζ</sup> )	6	Y59 (C)	93	3.77
P95 (C <sup>β</sup> )	84	W47 (C <sup>ε3</sup> )	93	3.70
P95 (C <sup>β</sup> )	84	W47 (C <sup>ζ3</sup> )	93	3.54
P95 (C <sup>γ</sup> )	84	P61 (C <sup>δ</sup> )	20	3.78
R96 (C <sup>ζ</sup> )	9	Y95 (C <sup>ε1</sup> )	10	3.65
СМ $d < 4.0 \text{ \AA}$				
R96 (N <sup>m1</sup> )	9	D97 (O <sup>δ1</sup> )	6	3.08
R96 (N <sup>m1</sup> )	9	D97 (O <sup>δ2</sup> )	6	3.56
R96 (N <sup>m2</sup> )	9	D97 (O <sup>δ1</sup> )	6	3.40
R96 (N <sup>m2</sup> )	9	D97 (O <sup>δ2</sup> )	6	2.44
Н <sub>связь</sub> $d < 3.5 \text{ \AA}$				
N34 (N <sup>δ2</sup> )	20	D97 (O <sup>δ1</sup> )	6	3.12
Q38 (O <sup>ε1</sup> )	94	Q39 (N <sup>ε2</sup> )	97	2.67
Q38 (N <sup>ε2</sup> )	94	Q39 (O <sup>ε1</sup> )	97	2.81
S43 (O <sup>γ</sup> )	47	G104 (O)	98	2.64
R46 (N <sup>m2</sup> )	13	T99 (O)	5	2.83
Y87 (O <sup>η</sup> )	84	Q39 (N <sup>ε2</sup> )	96	3.00
Y87 (O <sup>η</sup> )	84	N43 (O)	6	2.96

\* ИК – индекс консервативности, рассчитанный по Kabat Database of Sequence of proteins of Immunological interest [11] и представляющий собой процентное содержание данного аминокислотного остатка в антителах в гомологичных позициях. ВДВ – ван-дер-ваальсово взаимодействие. СМ – солевой мостик. В скобках указаны атомы аминокислотных остатков, непосредственно участвующие во взаимодействии.

**Таблица 2.** Атомные группы L- и H-цепей междоменного V<sub>L</sub> : V<sub>H</sub>-интерфейса Fab-LNKB-2, связанные через молекулы воды

Остаток	
V <sub>L</sub>	V <sub>H</sub>
D1 (O <sup>δ2</sup> )	N60 (O <sup>δ1</sup> )
R46 (N <sup>m1</sup> )	D97 (O <sup>δ1</sup> )
R46 (N <sup>m1</sup> )	F100 (O)
L50 (N)	D97 (O)
G91 (O)	D97 (O <sup>δ2</sup> )
R96 (O)	T47 (N)
R96 (N <sup>ε</sup> )	N35 (O <sup>δ1</sup> )
G99 (O)	L45 (N)

(рис. 3) показывает, что каждый из доменов имеет характерную для иммуноглобулинов укладку цепи типа “греческий ключ” [9], сформированную двумя скрученными слоями с антипараллельной β-структурой. Такая укладка стабилизирована межатомными взаимодействиями внутреннего гидрофобного ядра и одной внутривещечной дисульфидной связью. Пятизвеньевые слои CC'C"GF переменных доменов и четырехзвеньевые слои АВЕD константных доменов (рис. 3) образуют соответственно два развитых интерфейса контактных межцепочечных взаимодействий в форме β-бочонка, заполненного гидрофобными боковыми цепями. Наиболее характеристические взаимодействия, отражающие индивидуальность антитела, относятся к β-бочонку, образованному переменными доменами V<sub>L</sub> и V<sub>H</sub> (табл. 1). Около трех десятков остатков с обеих сторон образуют в междоменной области 16 стабилизирующих ван-дер-ваальсовых контактов ( $d < 3.85 \text{ \AA}$ ), семь водородных связей ( $d < 3.5 \text{ \AA}$ ) и 4 солевых мостика ( $d < 4.0 \text{ \AA}$ ). Из них пять взаимодействующих пар остатков имеют существенно консервативный характер с индексами консервативности (ИК, табл. 1) обоих участников >80%. Дополнительно две пары продольных участков междоменного β-бочонка L(96–100) : H(43–47) и L(43–48) : H(100–105) сшиты девятью молекулами воды через водородные связи (табл. 2). Общая площадь экранированной поверхности в четырехдоменной молекуле Fab-LNKB-2 занимает  $5629 \text{ \AA}^2$  (при радиусе сферического зонда  $1.4 \text{ \AA}$ ), что составляет 22% суммы площадей доступных поверхностей изолированных доменов [12]. Причем, площади экранированных поверхностей на междоменных интерфейсах V<sub>L</sub> : V<sub>H</sub> и C<sub>L</sub> : C<sub>H</sub> занимают соответственно  $1881$  и  $2305 \text{ \AA}^2$ .

**Антигенсвязывающий центр.** Шесть гипервариабельных областей, по три от каждого V<sub>L</sub>- и V<sub>H</sub>-доменов, расположенных в основном на петлевых участках с нерегулярной структурой, включаются в формирование специфического антигенсвязывающего центра Fab-LNKB-2 (рис. 4). Пять из них, в соответствии с конформациями основной цепи, отнесены по классификации Чотиа и Леск [7, 8] к известным каноническим структурам, характерным для иммуноглобулинов (табл. 3). Участок между консервативными остатками Cys H92 и Gly H104, содержащий неклассифицируемую (по Чотиа и Леск) гипервариабельную область CDR H3, имеет конформацию β-шпильки с петлей из шести остатков (H96–H100a). Антигенсвязывающий центр имеет чашеобразную форму и расположен на внешнем торце V<sub>L</sub> : V<sub>H</sub> междоменного β-бочонка. Его характерной особенностью, как и у других иммуноглобулинов, является повышенное содержание остатков тирозина. Из примерно двух десятков боковых цепей, выстилающих связывающий центр, семь принадлежат этим

**Таблица 3.** Отнесение гипервариабельных областей Fab-LNKВ-2 к известным каноническим [7, 8] классам

Гипервариабельная область	Фрагмент цепи	Канонический класс	PDB-код*	RMSD**, Å
CDR L1	L(24–34)	4	1rmf	0.42
CDR L2	L(50–56)	1	1lmk	0.34
CDR L3	L(89–97)	1	1tet	0.33
CDR H1	H(26–33)	2	1baf	0.56
CDR H2	H(52–56)	1	1gig	0.37
CDR H3	H(95–102)	–	–	–

\* Внутренние коды белкового банка данных (PDB) для структур, представляющих данный канонический класс.

\*\* Относительные среднеквадратичные отклонения позиций атомов основных цепей гипервариабельных петель Fab-LNKВ-2 и характерных структур, представляющих тот же канонический класс.

остаткам, что косвенным образом указывает на их особую функциональную роль. Из пятнадцати молекул воды, входящих в область центра связывания, пять находятся непосредственно внутри него и четыре из них экранируют донную часть (рис. 4). Детальный структурно-функциональный анализ антигенсвязывающего центра будет представлен в нашей следующей работе, посвященной рентгеноструктурному исследованию комплекса Fab-LNKВ-2 с пептидом, соответствующим участку 64–72 эпитопа интерлейкина-2.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Выделение антител и получение Fab-фрагментов.** Иммунизацию и культивирование гибридом LNKВ-2, выделение МА антител LNKВ-2 и получение Fab-фрагментов проводили по методикам, описанным в работах [1, 13]. Для наработки препаративных количеств антител гибридные клетки LNKВ-2 вводили мышам линии BALB/c. Выделенную асцитную жидкость подвергли очистке, и раствор мышинных антител диализовали против буфера, содержащего 25 мМ Трис-НСl (рН 7.3), 250 мМ NaCl, 1 мМ EDTA и 25 мМ меркаптоэтанол. Fab-LNKВ-2 получали гидролизом моноклональных антител папаином. После соответствующей очистки на колонке с DEAE-целлюлозой проводили препаративное разделение Fab-фрагментов на отдельные изоформы методом изоэлектрофокусирования. Фракция Fab с  $pI \sim 8.1$  была использована для кристаллизации.

**Кристаллизация и сбор рентгеновских экспериментальных данных.** Кристаллы свободного Fab-LNKВ-2 были получены в двух формах – 1 и 2 (табл. 4) методом висячей капли в условиях, описанных ранее [13]. Сбор дифракционных данных проводился на автодифрактометре R-AXIS II (Rigaku, Япония) с детектором Image Plate при комнатной температуре. Условия кристаллизации, кристаллографические и экспериментальные данные приведены в табл. 4.

**Определение структуры. Кристаллографическое уточнение.** Фазовая проблема для структур Fab-LNKВ-2 в обеих кристаллических формах была решена методом молекулярного замещения. Для определения структуры в форме 1 из Брукхэвского банка белковых структур (PDB) было выбрано девять моделей Fab-фрагментов с подходящими подтипами легкой (L) и тяжелой (H) цепей –  $\kappa$  и  $\gamma 1$  соответственно. Проверка выбранных кандидатов на молекулярное замещение проведена с помощью автоматизированного комплекса AMoRe [14]. Fab-фрагмент антитела к тирозидной пероксидазе (PDB код 1vge) имел максимальное значение корреляционного коэффициента  $S$  и минимальное значение  $R$ -фактора и был выбран в качестве основной модели для молекулярного замещения с помощью программного комплекса X-PLOR (версия 3.1 [16]).

Структура определена с использованием 8898 модулей структурных факторов в слое разрешения 10–3 Å и с ограничением  $F \geq 2\sigma_F$ . Радиус интегрирования при расчете функции вращения был выбран 30 Å. Поиску решения на завершающем этапе с помощью функции трансляции предшествовало уточнение относительной ориентации вариабельных и константных доменов структуры методом PC [17]. В процедуре молекулярного замещения стартовая величина характеристического локтевого угла модели  $\sim 130^\circ$  менялась в пределах от 120 до 145° с шагом 5°. Данный угол образован двумя псевдоосями второго порядка, одна из которых связывает между собой два вариабельных домена, а другая – два константных. Изменение этого угла в используемом комплексе X-PLOR моделировалось поворотом вариабельной части относительно константной вокруг оси, проходящей через центральные остатки Thr L114 и Ser H112 линкерных участков, соединяющих вариабельные и константные домены L- и H-цепей соответственно. Истинному решению, характеризующемуся максимальными значениями функций вращения и трансляции, отвечала структура с увеличенным на 10° значением локтевого угла.

Таблица 4. Кристаллографические и экспериментальные данные для Fab-LNKВ-2

Параметры	Кристаллическая форма		
	1	2	
Условия кристаллизации	13% ПЭГ-4000, 13% (по объему) 2-пропанол, 60 мМ Na-цитрат (pH ~ 5.6), конц. белка ~7–14 мг/мл	13% ПЭГ-4000, 7% (по объему) 2-пропанол, 60 мМ Na-HEPES (pH ~ 7.6), конц. белка ~7–14 мг/мл	
Молекулярная масса белка, кДа	~48	~48	
Пространственная группа	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	
Параметры элементарной кристаллической ячейки	$a, \text{Å}$	72.24	72.52
	$b, \text{Å}$	72.01	72.24
	$c, \text{Å}$	86.99	87.18
	$Z$	4	4
	$V_{\text{яч}}, \text{Å}^3$	452522.2	456722.5
Разрешение, Å	2.2	2.9	
Параметр Мэтьюза, Å <sup>3</sup> /Да	2.36	2.38	
Количество рефлексов ( $F \geq 0$ )	22492	9848	
Количество рефлексов ( $F \geq 2\sigma_F$ )	21459	9515	
Полнота набора, %	95.0	92.9	
$R_{\text{merge}}$	0.048	0.049	

Таблица 5. Статистические данные кристаллографического уточнения структур Fab-LNKВ-2

Параметры	Кристаллическая форма		
	1	2	
Число аминокислотных остатков	L-цепь	219	219
	H-цепь	220	220
Число неводородных атомов		3381	3381
Число молекул воды		213	99
$R$ -фактор ( $F \geq 0$ )		0.179	0.157
$R_{\text{free}}$ (по 10% данных, $F \geq 0$ )		0.229	0.241
$R$ -фактор ( $F \geq 2\sigma_F$ )		0.171	0.158
$R_{\text{free}}$ (по 10% данных, $F \geq 2\sigma_F$ )		0.221	0.241
Средний $B$ -фактор, Å <sup>2</sup>	вся структура белка	31.1	25.5
	основная цепь	29.1	24.6
	боковые цепи	31.0	25.7
	вода	40.5	31.4
RMSD $B$ -факторов*, Å <sup>2</sup>	основная цепь	2.3	2.5
	боковые цепи	3.9	4.0
RMSD параметров от идеальных значений**	валент. связи, Å	0.005	0.006
	валент. углы, град	1.33	1.33
	торс. углы, град	27.3	27.5
	планарность, град	0.84	0.91
	разрешенные	89.4	84.7
	дополнительно разрешенные	9.3	13.5
Статистика распределения углов $\phi$ и $\psi$ для 378 остатков (без учета Gly и Pro), по областям карты Рамачандрана, %	условно разрешенные	1.1	0.8
	запрещенные	0.3	1.1
Углы $\omega$ , град	среднее значение	179.7	179.8
	стандартное откл.	1.4	1.2
Позиционная ошибка (для разрешения выше 5.0 Å), Å	по Лузатти [22]	0.22	0.24
	sigmaa [23]	0.16	0.22
Стандартное отклонение хиральных углов $\zeta$ ( $C_{\alpha}$ -N-C- $C_{\beta}$ ), град		1.1	1.1

\* Относительное среднеквадратичное отклонение  $B$ -факторов для пар ковалентно связанных атомов.

\*\* Среднеквадратичные отклонения параметров от идеальных значений.

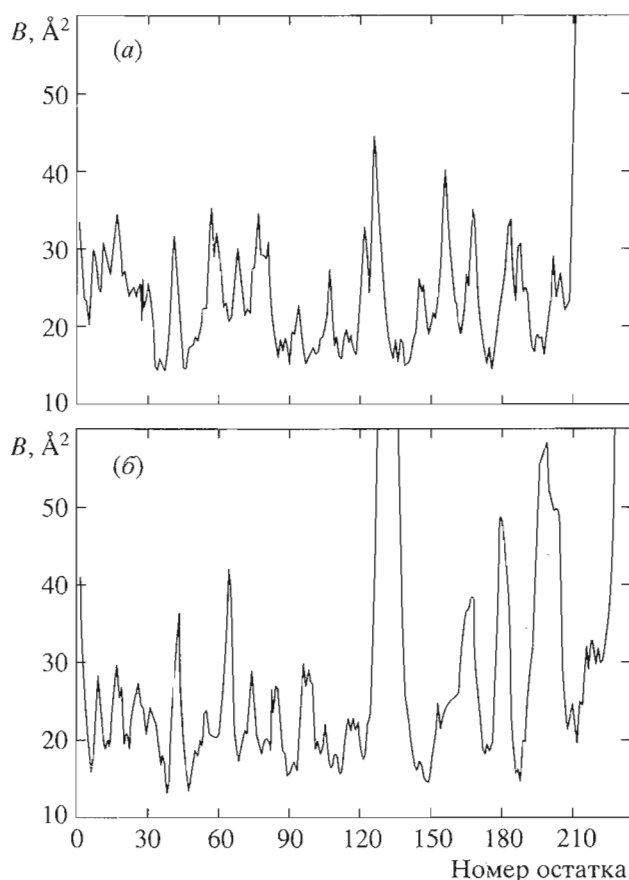


Рис. 5. Зависимость величины температурного  $B$ -фактора от положения остатка в легкой (а) и тяжелой (б) цепях Fab-LNKВ-2.

Предварительное кристаллографическое уточнение найденной структуры с доменами, представленными в виде твердых тел, по рефлексам с  $F \geq 2\sigma_F$  в слое разрешения 8–2.2 Å привело к значению  $R$ -фактора ~35%. Первый же раунд стандартного уточнения по программе CNS [18] с привлечением торсионной молекулярной динамики и процедуры медленного охлаждения, начиная с  $T$  3000 К, снизил величину  $R$ -фактора до 23%.

Последующее кристаллографическое уточнение структуры Fab-LNKВ-2 в кристаллической форме 1 проводилось также по программе CNS в несколько циклов попеременно с ручной правкой модели в электронной плотности на графической станции Silicon Graphics OCTANE с помощью программы CHAIN [19]. В использованном программном комплексе рентгеновский член минимизируемого функционала был представлен функцией максимальной достоверности (maximum likelihood function) [20]. На каждом этапе уточнения осуществлялась коррекция структурных факторов  $F_c$  на влияние неупорядоченного растворителя [21].

При определении структуры Fab-LNKВ-2 в кристаллической форме 2 в качестве модели для

молекулярного замещения использовалась уже установленная структура в кристаллической форме 1. Последующее уточнение проводилось по описанной выше методике. Статистические данные уточнения для обеих структур представлены в табл. 5.

Электронная плотность типа sigmaa, рассчитанная для уточненной структуры по коэффициентам  $2F_o - F_c$ , характеризуется высоким качеством и, в целом, хорошо соответствует аминокислотной последовательности белка. Исключение составляет диффузно-прерывистый характер электронной плотности на трех участках белковой цепи L(212–214), H(128–135) и после H223, являющийся следствием повышенного теплового движения атомов соответствующих фрагментов (рис. 5). В обеих структурах, отвечающих кристаллическим формам 1 и 2, локализовано соответственно 213 и 99 молекул упорядоченной воды, располагающихся в первом и втором структурированных слоях на поверхности Fab-LNKВ-2 и характеризующихся высотой пика электронной плотности  $>1.0\sigma$ , величиной температурного фактора  $B < 75 \text{ \AA}^2$  и длиной водородной связи с ближайшими атомами белка в интервале 2.5–3.4 Å.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lunev V.E., Lukin Yu.V., Kazannekh N.V., Belyaev S.V., Zubov V.P., Nesmeyanov V.A. // Biomed. Sci. 1990. V. 1. P. 68–72.
2. Smith K. Interleukin 2. San Diego: Academic Press, 1988.
3. Оноприенко Л.В., Михалева И.И., Лунев В.Е., Несмеянов В.А., Иванов В.Т. // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. С. 908–921.
4. Пасхин А.И., Головина Т.Н., Несмеянов В.А., Коробко В.Г. // Биооргани. химия. 1995. Т. 21. С. 430–435.
5. Kabat E.A., Wu T.T., Reid-Miller M., Perry H.M., Gottesman K.S. Sequence of Proteins of Immunological Interest. National Institutes of Health, Bethesda, Md, 5th ed. 1991.
6. Isogai Y., Nemethy G., Rackovsky S., Leach S.J., Sherga H.A. // Biopolymers. 1980. V. 19. P. 1183–1210.
7. Chothia C., Lesk A.M., Tramontano A., Levitt M., Smith-Gill S.J., Air G., Sheriff S., Padlan E.A., Davies D., Tulip W.R., Golman P.M., Spinelli S., Alzari P.M., Poljak R.J. // Nature. 1989. V. 342. P. 877–883.
8. Martin A.C.R. // Proteins: Structure, Function and Genetics. 1996. V. 25. P. 130–133.
9. Richardson J.S. // Adv. Protein Chem. 1981. V. 34. P. 167–339.
10. Stanfield R.L., Fieser T.M., Lerner R.A., Wilson I.A. // Science. 1990. V. 248. P. 712–719.
11. Johnson G., Kabat E.A., Wu T.T. // Weir's Handbook of Experimental Immunology. I. Immunochemistry and Molecular Immunology. Fifth Ed. Chapter 6 / Ed. L.A. Herzenberg, W.M. Weir, L.A. Herzenberg, C. Blackwell. Blackwell Science Inc., Cambridge, Ma, 1996. P. 6.1–6.21.

12. Vriend G. // *J. Mol. Graph.* 1990. V. 8. P. 52–56.
13. Михайлова И.Ю., Мареева Т.Ю., Цыганник И.Н., Михалева И.И., Оноприенко Л.В., Вихров А.А., Марквичева Е.А., Пэнгборн В., Дюэкс В., Несмеянов В.А., Плетнев В.З. // *Биоорганич. химия.* 1999. Т. 25. С. 247–252.
14. Navaza J. // *Acta Crystallog.* 1994. V. A50. P. 157–163.
15. Chacko S., Padlan E.A., Portolano S., McLachlan S.M., Rapoport B. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 12191–12198.
16. Brunger A.T. X-PLOR (Version 3.1/3.851) Manual. Yale University, New Haven, Ct, 1992.
17. Brunger A.T. // *Acta Crystall.* 1990. V. A47. P. 195–204.
18. Brunger A.T., Adams P.D., Clore G.M., DeLano W.L., Gros P., Grosse-Kunstleve R.W., Jiang J.S., Kuszewski J., Nilges M., Pannu N.S., Read R.J., Rice L.M., Simonson T., Warren G.L. // *Acta Crystallogr.* 1998. V. D54. P. 905–921.
19. Jones T.A. // *J. Appl. Crystallogr.* 1978. V. 11. P. 268–272.
20. Adams P.D., Pannu N.S., Read R.J., Brunger A.T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. P. 5018–5023.
21. Jian J.S., Brunger A.T. // *J. Mol. Biol.* 1994. V. 243. P. 100–105.
22. Luzatti P. V. // *Acta Crystallogr.* 1952. V. 5. P. 802–810.
23. Read R.J. // *Acta Crystallogr.* 1986. V. A42. P. 140–149.

## The Three-dimensional Structure of the Antigen-binding Fragment of a Monoclonal Antibody to Human Interleukin-2 in Two Crystal Forms at 2.2 and 2.9 Å Resolution

A. V. Fokin\*, P. V. Afonin\*, I. Yu. Mikhailova\*, I. N. Tsygannik\*, T. Yu. Mareeva\*, V. A. Nesmeyanov\*, W. Pangborn\*\*, N. Lee\*\*, W. Duax\*\*, E. Ciszak\*\*\*, and V. Z. Pletnev\*\*

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

\*\*Hauptman–Woodward Medical Research Center, Buffalo, NY, 14203 United States

\*\*\*NASA, Marshal Space Flight Center, Huntsweel, AL, United States

The three-dimensional structure of the antigen-binding fragment of a monoclonal antibody to human interleukin-2 was determined in two crystal forms by the X-ray method of molecular replacement at 2.2 and 2.9 Å resolutions. The spatial structure of the protein and the stereochemistry of its antigen-binding site were analyzed.

*Key words:* monoclonal antibody, antigen-binding fragment, interleukin-2, X-ray analysis

# To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 330-7510, e-mail: pletnev@tek.siobc.ras.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 8. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.