



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.

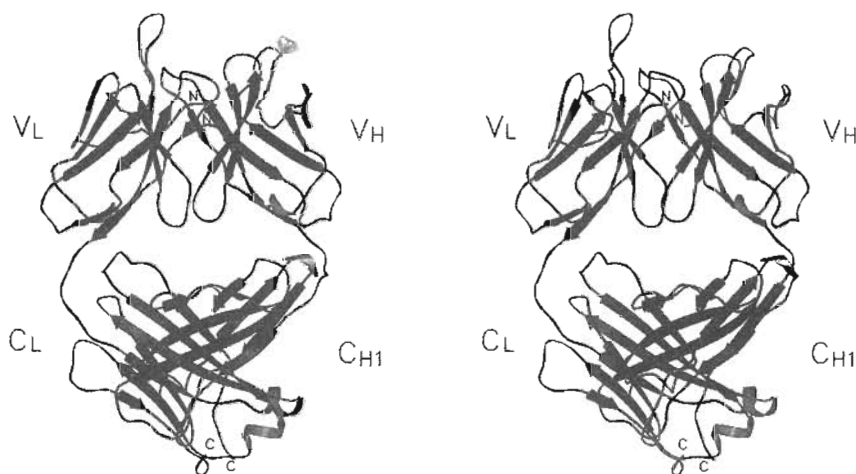
**Пространственная организация.** Структуры кристаллических форм 1 и 2 Fab-LNKB-2, установленные соответственно при разрешении 2.2 и 2.9 Å, как и следовало ожидать, оказались практически идентичными; относительное среднеквадратичное отклонение атомов основной цепи для них составило 0.48 Å. В этой связи, 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.siobc.ras.ru).

L1	L10	L20	L27 <sub>abcde</sub>	L40	L50		
<b>V<sub>L</sub>:</b> DVQMTQTPLTLSVTIGQPASISCESSQSLLYSNGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVP							
L60	L70	L80	L90	L100			
<b>V<sub>L</sub>:</b> DRFTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLVVYCVQGTHTFPRTFGGGKLEIKRA							
L110	L120	L130	L140	L150	L160	L170	
<b>C<sub>L</sub>:</b> DAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSTY							
L180	L190	L200	L210				
<b>C<sub>L</sub>:</b> SMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSSTPIVKSFNRNEC							
H1	H10	H20	H30	H35 <sub>a</sub>	H40	H50	H60
<b>V<sub>H</sub>:</b> GVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGTGYSITSDYAWNWIHQFPGNKLEWVMGYITYSGSTGYNPSL							
H70	H82 <sub>abc</sub>	H90	H100 <sub>a</sub>	H110			
<b>V<sub>H</sub>:</b> KSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCASYYDDYTWFTYWGQGTIVTVSA							
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							

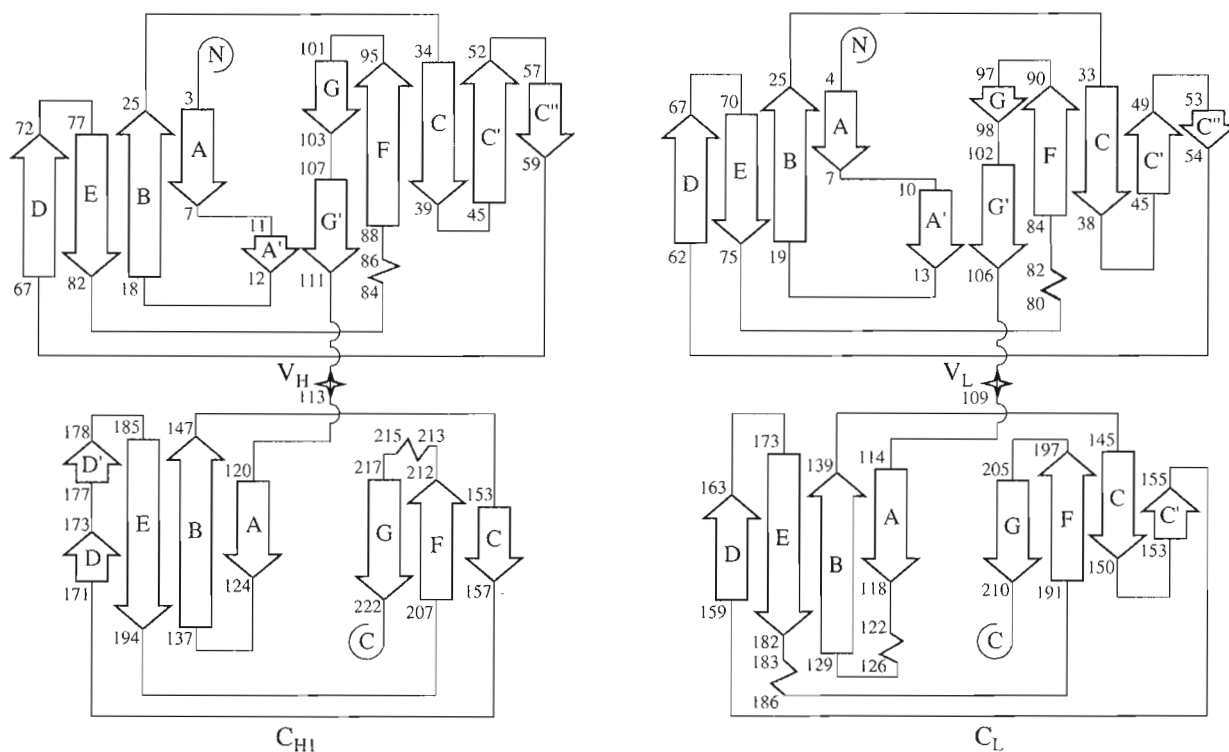
**Рис. 1.** Аминокислотная последовательность переменных ( $V_L$ ,  $V_H$ ) [4] и константных ( $C_L$ ,  $C_{H1}$ ) [5] доменов соответственно легкой (L) и тяжелой (H) цепей Fab-LNKB-2 с нумерацией остатков по номенклатуре Кэбата [5]. Последняя цифра номера расположена над остатком, отвечающим данному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



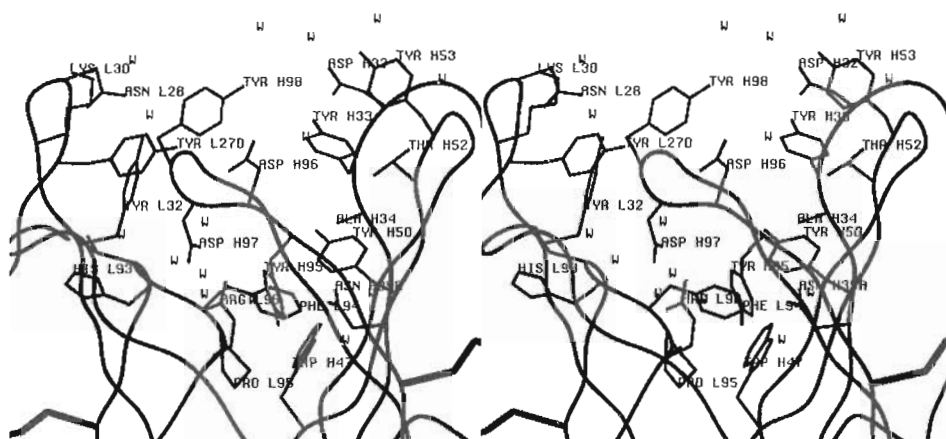
**Рис. 2.** Стереорепрезентация пространственной структуры Fab-LNKB-2. Индексами  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  и  $C_{H1}$  обозначены соответственно переменные и константные домены легкой (L) и тяжелой (H) цепей.

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-



**Рис. 3.** Топология укладки элементов вторичной структуры Fab-LNKB-2. Индексами  $V_L$ ,  $V_H$  и  $C_L$ ,  $C_{H1}$  обозначены переменные и константные домены легкой (L) и тяжелой (H) цепей; стрелками и зигзагами изображены соответственно  $\beta$ -структурные и  $\alpha$ -спиральные участки.



**Рис. 4.** Стереорепрезентация структуры антигенсвязывающего центра Fab-LNKB-2. Буквы W обозначают молекулы воды.

ной области CDR L2 [7, 8] на участке L(49–53) и представляет собой комбинацию двух перекрывающихся индивидуальных  $\beta$ -изгибов 49–52 (I') и 50–53 (II') [9].

Топологически близкие переменные домены обеих цепей связаны поворотом вокруг псевдооси симметрии 2-го порядка на угол  $\sim 173^\circ$  и трансляцией вдоль нее на  $\sim 0.1$  Å. Аналогично, константные домены могут быть смещены пу-

тем поворота вокруг соответствующей псевдооси на  $\sim 170^\circ$  с последующей трансляцией на  $\sim 0.5$  Å. Величина характеристического угла, называемого локтевым, между этими осями симметрии составляет  $\sim 143^\circ$  и располагается в интервале характерных для семейства иммуноглобулинов значений  $130$ – $180^\circ$  [10].

Топология укладки элементов вторичной структуры легкой и тяжелой цепей Fab-LNKB-2

**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. Пятизвенные слои CC'C"GF переменных доменов и четырехзвенные 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 РС [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 Люзатти [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 среднее квадратичное отклонение  $B$ -факторов для пар ковалентно связанных атомов.

\*\* Среднее квадратичные отклонения параметров от идеальных значений.

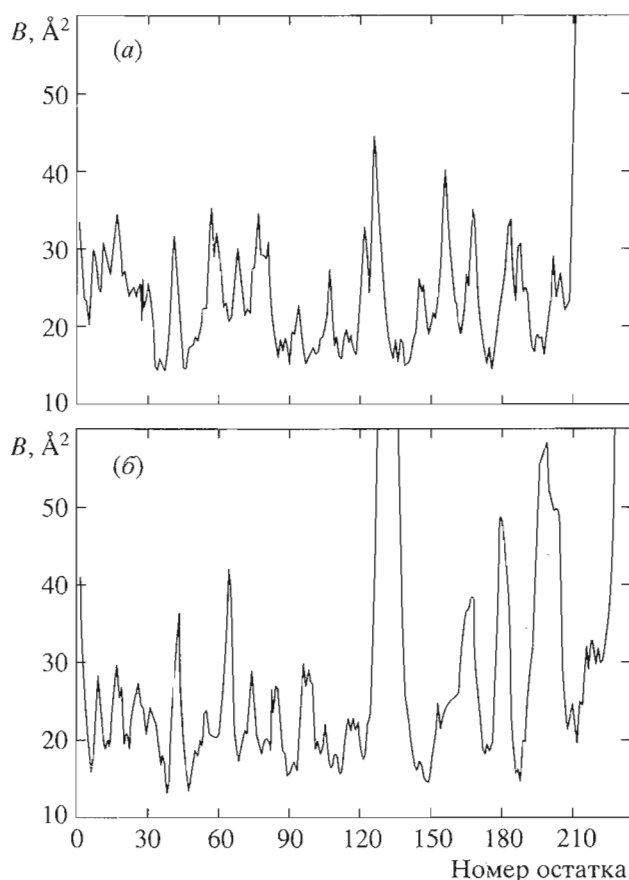


Рис. 5. Зависимость величины температурного  $B$ -фактора от положения остатка в легкой (а) и тяжелой (б) цепях Fab-LNKВ-2.

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  $\sim 35\%$ . 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. // *Биоорганическая химия*. 1989. Т. 15. С. 908–921.
4. Пасхин А.И., Головина Т.Н., Несмеянов В.А., Коробко В.Г. // *Биоорганическая 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/>.