

**ХИМИЯ**  
**CHEMISTRY**УДК [577.112.853+577.112.854]:57.083.3:615.281.8  
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-4-404-413>Поступило в редакцию 12.04.2022  
Received 12.04.2022**Д. А. Семенов<sup>1</sup>, И. И. Вашкевич<sup>1</sup>, А. С. Владыко<sup>2</sup>, О. В. Свиридов<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь<sup>2</sup>Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,  
Минск, Республика Беларусь**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА  
И ВИРУСА SARS-CoV-2 С БЕЛКОВЫМ КОНЬЮГАТОМ ГЕПАРИНА***(Представлено членом-корреспондентом С. А. Усановым)*

**Аннотация.** Преимущества комплекса рекомбинантного лактоферрина человека (рчЛФ) с ионами европия использованы для установления количественных параметров специфического взаимодействия рчЛФ с иммобилизованным белковым конъюгатом гепарина как моделью гепарансульфат протеогликанов клеток. Продукт присоединения гепарина к инертному белку синтезирован в реакции восстановительного аминирования и адсорбирован посредством белковой части в лунках полистирольного микропланшета. Полученный из нативного рчЛФ комплекс рчЛФ–Eu<sup>3+</sup> содержит 0,8 моль иона лантанида на моль белка (степень насыщения 40 %). Равновесие в гетерофазной системе связывания устанавливается в течение 1 мин при комнатной температуре, и рассчитанная константа ассоциации комплекса рчЛФ–гепарин составляет  $2,1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ . Обратимый и насыщаемый характер связывания с гепарином рчЛФ, меченного по активному центру Eu<sup>3+</sup>, подтвержден переходом рчЛФ–Eu<sup>3+</sup> в жидкую фазу при внесении в систему 1000-кратного мольного избытка немеченного рчЛФ. Выявлен основанный на сродстве рчЛФ к гликозаминогликану блокирующий эффект этого белка на связывание вируса SARS-CoV-2 с иммобилизованным гепарин-белковым конъюгатом, имитирующим протеогликан на поверхности клетки-хозяина. Предварительная обработка адсорбированного конъюгата раствором рчЛФ (10 мкг на лунку) уменьшает примерно на 80 % специфическое связывание 100 нг вирусных частиц, внесенных в лунку. Представленные результаты позволяют, в частности, оценивать целостность структуры и активность рчЛФ в качестве возможной субстанции пищевых добавок и фармацевтических средств и могут быть полезными в разработках комбинированных лекарств от коронавирусной инфекции.

**Ключевые слова:** рекомбинантный лактоферрин человека, вирус SARS-CoV-2, гепарин, гепарансульфат протеогликан

**Для цитирования.** Взаимодействие рекомбинантного лактоферрина человека и вируса SARS-CoV-2 с белковым конъюгатом гепарина / Д. А. Семенов [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2022. – Т. 66, № 4. – С. 404–413. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-4-404-413>

**Dmitry A. Semenov<sup>1</sup>, Irina I. Vashkevich<sup>1</sup>, Aleksandr S. Vladyko<sup>2</sup>, Oleg V. Sviridov<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*<sup>2</sup>*Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus***INTERACTION OF RECOMBINANT HUMAN LACTOFERRIN AND SARS-COV-2 VIRUS  
WITH HEPARIN-PROTEIN CONJUGATE***(Communicated by Corresponding Member Sergey A. Usanov)*

**Abstract.** The advantages of the complex of recombinant human lactoferrin (rhLF) with europium ions have been used to establish quantitative parameters of specific interaction of rhLF with immobilized heparin-protein conjugate as a model of cell-surface heparan sulfate proteoglycans. Heparin coupled through terminal formyl by reductive amination to an inert

protein was adsorbed through the protein part in the wells of a polystyrene microplate. The rhLF–Eu<sup>3+</sup> complex obtained from native rhLF contains 0.8 mol of lanthanide ion per mol of protein (40 % saturation level). Equilibrium in the heterophase binding system is established within 1 min at room temperature, and the calculated association constant of the rhLF-heparin complex is  $2.1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ . The reversible and saturable character of binding rhLF labeled by Eu<sup>3+</sup> at the active site to heparin was confirmed by the transition of rhLF–Eu<sup>3+</sup> into the liquid phase when a 1000-fold molar excess of unlabeled rhLF was added to the system. Based on the affinity of rhLF for glycosaminoglycan, a blocking effect of this protein on the binding of the SARS-CoV-2 virus to the immobilized heparin-protein conjugate that imitates proteoglycan on the host cell surface was revealed. Pretreatment of the adsorbed conjugate with a solution of rhLF (10 µg per well) reduces the specific binding of 100 ng of viral particles added to the well by approximately 80 %. The presented results allow one, in particular, to evaluate the integrity of the structure and activity of rhLF as a possible substance in food supplements and pharmaceuticals and may be useful in developing combined drugs for corona virus infection.

**Keywords:** recombinant human lactoferrin, SARS-CoV-2 virus, heparin, heparan sulfate proteoglycans

**For citation.** Semenov D. A., Vashkevich I. I., Vladyko A. S., Sviridov O. V. Interaction of recombinant human lactoferrin and SARS-CoV-2 virus to heparin-protein conjugate. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2022, vol. 66, no. 4, pp. 404–413 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-4-404-413>

**Введение.** Лактоферрин (ЛФ) – это широко известный белок с выдающимися биологическими свойствами, необходимость или полезность которого для человека доказаны во множестве научных статей [1] и весьма широко представлены в публицистической литературе. Физиологические функции ЛФ, входящего в состав различных секреторных жидкостей и некоторых клеток организма, определяются его способностью обратимо хелатировать ионы железа и взаимодействовать с целым рядом биологических макромолекул, благодаря особенностям аминокислотной последовательности и доменной глобулярной структуры единственной полипептидной цепи. Одной из важнейших черт этого гликопротеина с молекулярной массой ~80 кДа является высокий общий положительный заряд: изоэлектрическая точка лежит при pH ~ 8,7. Однако заряд неравномерно распределен по молекуле, и функционально важным примером этого служит экспонированная в раствор N-концевая последовательность Arg<sup>2</sup>–Arg<sup>3</sup>–Arg<sup>4</sup>–Arg<sup>5</sup> в комбинации с пространственно близким ей катионизированным фрагментом 27–30 на поверхности глобулы. Указанные структурные участки формируют предполагаемый сайт связывания молекулой ЛФ биологических полианионов, таких как гепарин, другие гликозаминогликаны, ДНК, липополисахарид, некоторые белки [2].

Ценный для здоровья человека белок ЛФ в самом ближайшем будущем должен найти практическое применение в виде биологически активных добавок в продуктах специализированного питания и лекарственных препаратов, выпускаемых пищевой индустрией и фармацевтической промышленностью Беларуси. Субстанцией будет служить высокоочищенный рекомбинантный биоаналог ЛФ человека (рчЛФ) из молока трансгенных коз [3], технология выделения которого и физиологические эффекты [4], антимикробные и антиоксидантные свойства [5], а также металл-связывающая активность [6] и методики иммунохимического анализа [7] описаны, в частности, в отечественной литературе.

Дополнительной важной характеристикой рчЛФ должны стать данные о его специфическом взаимодействии с биологическими макромолекулами, в том числе с отрицательно заряженными биополимерами, за счет правильно структурированных катионных кластеров белка. Это можно рассматривать даже как один из параметров контроля качества рчЛФ при его производстве. Действительно, в одной из пионерских работ в данной области [8] авторы изучали сродство природного ЛФ к нескольким видам макромолекулярных анионов, в том числе к гепарину, и сопоставили полученные данные с характеристиками взаимодействия рчЛФ из молока трансгенных мышей с теми же объектами для подтверждения идентичности структур природного и рекомбинантного белков и прогнозирования их одинаковых антибактериальных и противовоспалительных свойств.

Цель настоящей работы – характеристика активностей рчЛФ, обусловленных структурными участками, которые удалены и независимы от обоих Fe<sup>3+</sup>-связывающих центров, путем установления специфичности и количественных параметров взаимодействия рекомбинантного белка с гепарином, иммобилизованным на твердой фазе в составе конъюгата с альбумином сыворотки быка (БСА). Важным и, пожалуй, решающим отличием примененного нами методического под-

хода является использование в экспериментах интактного рчЛФ, биологически меченного по металлсвязывающему центру способным к флуоресценции лантанидом, вместо поврежденной химической модификацией белковой метки.

В развитие работы проведен эксперимент, в котором выявленная гепаринсвязывающая активность рчЛФ подавляет прикрепление вируса SARS-CoV-2 к твердофазному конъюгату гепарин-БСА, моделирующему протеогликан на поверхности клетки-хозяина.

Полученные результаты могут быть практически полезными при разработке критериев качества рчЛФ как субстанции пищевых добавок и фармацевтических средств, а также в поиске комбинированных лекарств от коронавирусной инфекции.

**Материалы и методы исследования.** *Реактивы, препараты и приборы.* Препарат рчЛФ с чистотой не менее 98 %, выделенный из молока трансгенных коз-продуцентов [3; 4], в виде сухого порошка получен от НПЦ НАН Беларуси по животноводству. Для определения концентрации белка в растворе измеряли характеристики поглощения с помощью спектрофотометра Specord M40 (Carl Zeiss, Германия).

В Институте биоорганической химии НАН Беларуси изготовлен диссоциативно-усиливающий раствор для лантанидного иммунофлуориметрического анализа (ЛИФМА). В экспериментах с применением метода иммуноферментного анализа (ИФА) использовался стабилизированный раствор хромоген-субстратной смеси (3,3',5,5'-тетраметилбензидин/ $H_2O_2$ ) от фирмы-изготовителя Иммунотех (Чехия). Раствор хлорида европия (III) приготовлен в Институте химии новых материалов НАН Беларуси. Точную концентрацию ионов европия в этом растворе определяли прямым комплексонометрическим титрованием динатриевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты с использованием ксиленолового оранжевого в качестве индикатора. Содержание ионов железа в приготовленном растворе хлорида железа (III) устанавливали фотометрически по интенсивности окрашивания комплекса восстановленного солью гидроксиламина двухвалентного железа с о-фенантролином. Хроматографическая колонка PD-10 (Сефадекс G-25) для обессоливания растворов биополимеров куплена у фирмы GE Healthcare (США). Разборные полистирольные микропланшеты повышенной сорбционной емкости от Хема (Россия) применяли для конструирования гетерофазных систем ИФА и ЛИФМА. Другими реактивами служили соли, основания и кислоты высокой степени чистоты, доступные от поставщиков химреактивов в Республике Беларусь, а также БСА,  $NaCNBH_3$ , детергенты, бактериостатики, приобретенные у фирмы Sigma-Aldrich (США), тринатриевая соль нитрилтриуксусной кислоты моногидрат фирмы Alfa Aesar (США), сахароза (AppliChem, Германия), сорбит (Glentham Life Sciences, Великобритания).

Во всех экспериментах нашей работы использовали деионизированную воду с удельным электрическим сопротивлением 17–18 МОм · см, полученную в модульной системе очистки воды Arium® pro VF фирмы Sartorius (Германия).

Постановки ИФА и ЛИФМА выполняли в микропланшетном термощейкере PST-60HL с возможностью регулирования интенсивности встряхивания и температуры (Biosan, Латвия). Для измерения оптической плотности растворов при 450 нм в лунках микропланшета использовали прибор SPECTROstar NANO (BMG Labtech, Германия). Интенсивность времяразрешенной флуоресценции  $Eu^{3+}$  при длинах волн возбуждения и регистрации 340 и 613 нм с временной задержкой 400 мкс измеряли в микропланшетном флуориметре Delfia 1234 фирмы Wallac Oy (Финляндия).

*Конъюгат гепарин–БСА.* Нефракционированный гепарин был конъюгирован с аминоксислотой БСА через альдегидную группу свободного редуцирующего конца гликозаминогликана реакцией восстановительного аминирования по описанной методике [9]. В эксперименте гепарин (15,0 мг) и БСА (10,0 мг) растворяли в 1,0 мл 0,1 М ацетатного буфера, pH 5,0, содержащего 62,8 мг/мл цианоборогидрида Na. Эту реакционную смесь инкубировали в лабораторном термостате Heraeus (Германия) при 37 °C в течение 24 ч. Очистку конъюгата от непрореагировавших гепарина и БСА, а также низкомолекулярных примесей осуществляли эксклюзионной хроматографией в 0,3 М NaCl на колонке Superdex® 200 Prep Grade (GE Healthcare, США) в автоматической

системе ÄKTA pure (GE Healthcare, США). Для идентификации и выявления степени чистоты полученного конъюгата выполняли электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом Na без обработки 2-меркаптоэтанолом.

Продукт присоединения гепарина к инертному белку адсорбировали через белковую часть в лунках пластмассового микропланшета из 100 мкл раствора с концентрацией конъюгата 5,0 мг/л в 0,1 М  $\text{NaHCO}_3$  выдерживанием в течение ночи при 4 °С. После промывки три раза по 200 мкл натрий-фосфатным буфером (НФБ), pH 7,4, содержащим Tween-20, блокировали свободные участки поверхности лунок и стабилизировали иммобилизованный конъюгат раствором НФБ, pH 7,4, включающим БСА, сахарозу, сорбит, тиомерсал (200 мкл на лунку). С целью дальнейшего хранения и использования для изучения взаимодействия гепарина с рчЛФ микропланшеты высушивали.

*Параметры связывания комплекса рчЛФ– $\text{Eu}^{3+}$  с конъюгатом гепарин–БСА.* Для расчета по графику в координатах Скэтчарда количественных параметров взаимодействия рчЛФ, меченного по металлсвязывающему центру ионами европия, с иммобилизованным на твердой фазе белковым конъюгатом гепарина вносили в функционализированные лунки микропланшета по 100 мкл раствора комплекса рчЛФ– $\text{Eu}^{3+}$  в трис-НСI буфере, pH 7,4, содержащем Tween-20,  $\text{NaN}_3$ , БСА (раствор для разведения в ЛИФМА), в диапазоне концентраций от 3,0 до 500,0 нМ. Инкубацию проводили в термошейкере со встряхиванием при 25 °С в течение 1 ч для установления равновесия в системе. После трехкратной промывки лунок микропланшета трис-НСI буферным раствором, pH 7,4, без БСА (промывочный раствор в ЛИФМА) вносили по 100 мкл диссоциативно-усиливающего раствора и через 10 мин измеряли интенсивность флуоресценции ионов европия, высвободившихся из связанного с гликозаминогликаном рчЛФ– $\text{Eu}^{3+}$ .

С целью оценки кинетических параметров ассоциации рчЛФ с гепарин-белковым конъюгатом в лунки микропланшета вносили по 100 мкл раствора комплекса рчЛФ– $\text{Eu}^{3+}$  с концентрацией 125,0 нМ и инкубировали в термошейкере со встряхиванием при 25 °С в течение разных промежутков времени, начиная с 1 мин, до 1 ч. После обработки лунок промывочным раствором в ЛИФМА добавляли диссоциативно-усиливающий раствор и измеряли сигнал флуоресценции микропланшетным флуориметром. Для изучения кинетики диссоциации уже связанного рчЛФ– $\text{Eu}^{3+}$  на твердой фазе с конъюгатом гепарин–БСА после инкубации меченого рчЛФ в течение 5 мин и промывки лунок вносили 1000-кратный мольный избыток (~10 мкг) немеченого рчЛФ по отношению к максимальной связывающей емкости сорбента, определенной по графику Скэтчарда. Затем также проводили инкубации в течение разных временных промежутков на протяжении 1 ч, а после промывки лунок и внесения диссоциативно-усиливающего раствора детектировали интенсивность флуоресценции с разрешением во времени.

*Влияние рчЛФ на связывание вируса SARS-CoV-2 с конъюгатом гепарин–БСА.* Для оценки конкурентного ингибирования связывания вируса SARS-CoV-2 с белковым конъюгатом гепарина в присутствии рчЛФ иммобилизованный конъюгат обрабатывали раствором рекомбинантного белка (10 мкг на лунку) в НФБ, pH 7,4, включающим Tween-20, тиомерсал и БСА. После промывки раствором без БСА в лунки микропланшета вносили вирусные частицы SARS-CoV-2 (7763), которые были получены в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, в количестве 100 нг. Образовавшийся на твердой фазе комплекс гепарина с вирусом выявляли путем последовательного внесения разведенной в 100 и 1000 раз сыворотки крови человека, содержащей антитела к вирусу, и антивидовых антител, меченных пероксидазой из корней хрена (Abscam ab97225, Великобритания), в разведении 1 : 5000. Количество связавшегося фермента оценивали путем измерения оптической плотности раствора в лунках после добавления хромоген-субстратной смеси. В качестве контроля проводились эксперименты без обработки функционализированной твердой фазы раствором рчЛФ, а также с применением сыворотки крови человека, не перенесшего коронавирусную инфекцию.

Все эксперименты в данном исследовании проводили не менее чем в трех повторях, достоверность  $p < 0,05$ . Обработку данных осуществляли с помощью программы Microsoft Excel. На графиках планки погрешностей обозначают стандартное отклонение экспериментальных значений.

**Результаты и их обсуждение.** Для количественной характеристики катион-анионных взаимодействий с участием рчЛФ мы разработали гетерофазную систему лиганд-белкового связыва-



ния, в которой в качестве анионного лиганда выступает гепарин, адсорбированный в лунках микропланшета через полипептидную часть конъюгата с БСА, а белок представлен комплексом рчЛФ– $\text{Eu}^{3+}$  в жидкой фазе. Определение количества связанного рчЛФ на твердой фазе достигается диссоциацией иммобилизованного комплекса в добавляемом хелатно-детергентном растворе с пониженным рН и измерением интенсивности флуоресценции образовавшегося хелата  $\text{Eu}^{3+}$  с разрешением во времени. Наряду с установлением кинетических и равновесных параметров связывания в системе можно измерить показатели обратимости и специфичности взаимодействия, влияние температуры, а также органических и минеральных компонентов среды на этот процесс. Некоторые из таких экспериментов проведены нами, и далее переходим к представлению и обсуждению полученных результатов.

**Компоненты системы связывания.** Главными и постоянными компонентами гетерофазной системы нековалентного связывания белка с гликозаминогликаном являются комплекс рчЛФ– $\text{Eu}^{3+}$  в растворе и конъюгат гепарин–БСА, иммобилизованный путем физической адсорбции на внутренней поверхности лунок полистирольного микропланшета (рис. 1). Также постоянными (за исключением специальных экспериментов) поддерживались солевой состав (0,05 М трис- $\text{HCl}$ , 0,15 М  $\text{NaCl}$ , 0,02 % Tween-20, 0,05 %  $\text{NaN}_3$ , 0,1 % БСА) и рН (7,4) жидкой фазы, при которых не блокировалось взаимодействие рчЛФ с гепарином и не протекала элюция связанного с гликозаминогликаном белка. Нативность или денатурированное состояние препаратов рчЛФ устанавливалось спектрофотометрически или флуориметрически по связыванию соответственно  $\text{Fe}^{3+}$  или  $\text{Eu}^{3+}$  [6], а также определением иммунореактивности по отношению к специфическим поликлональным антителам [7]. Неповрежденная структура комплекса рчЛФ– $\text{Eu}^{3+}$  подтверждалась его активностью в ЛИФМА [7] и удерживанием  $\text{Eu}^{3+}$  в присутствии хелатирующих агентов в невысоких концентрациях при нейтральных значениях рН [6].

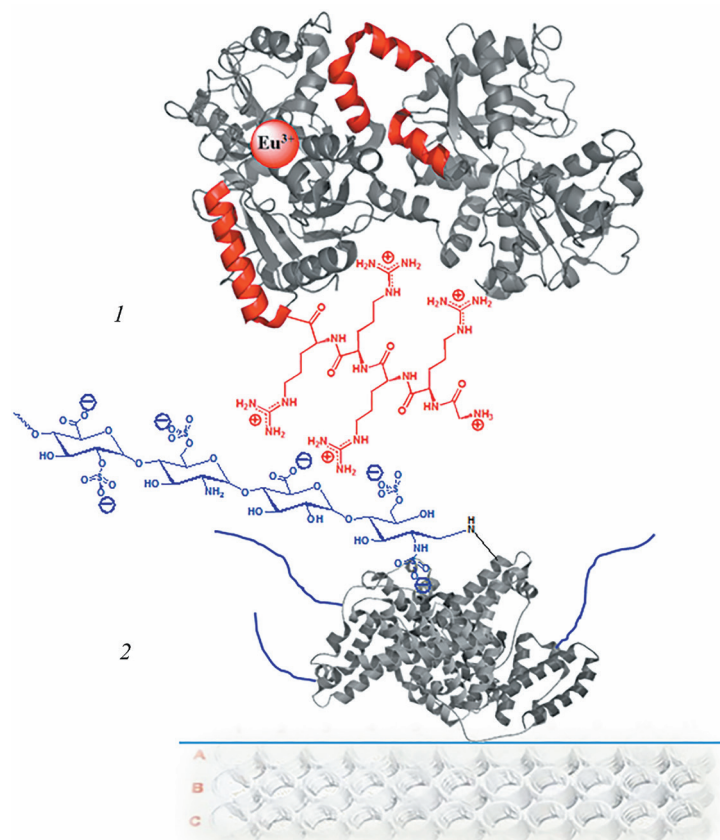


Рис. 1. Схематическое изображение гетерофазной системы связывания:  
1 – комплекс рчЛФ– $\text{Eu}^{3+}$  в растворе; 2 – конъюгат гепарин–БСА на твердой фазе

Fig. 1. Schematic illustration of the heterophase binding system: 1 – rhLF– $\text{Eu}^{3+}$  complex in a solution; 2 – the conjugate of heparin and bovine serum albumin (BSA) on a solid phase

Выбор способа опосредованного покрытия твердой фазы гепарином основывался на литературных данных. Стадии первоначальной адсорбции катионного белка протамин сульфата в лунках микропланшета с последующим связыванием отрицательно заряженной молекулы гепарина [8] из-за непредсказуемости и возможной подвижности конечной структуры показались нам менее предпочтительными, чем адсорбционная иммобилизация на твердой фазе конъюгата гепарин–БСА через его белковую часть. Действительно, во втором случае гепариновые цепи присоединяются к инертному белку за счет своего концевого атома, строго ориентированы в раствор и полностью сохраняют многочисленные отрицательные заряды (рис. 1). Конъюгирование гепарина с БСА мы осуществили методом восстановительного аминирования [9], а высокоэффективную очистку продукта провели на автоматической установке для быстрой гель-хроматографии белков. Методика иммобилизации конъюгата обеспечивает устойчивость гепаринизированной твердой фазы к рабочим концентрациям детергентов, солей и ионов водорода в жидкой фазе при длительном (несколько суток) выдерживании на холоде, при комнатной температуре и умеренном нагреве.

В литературе для детекции связывания ЛФ с иммобилизованными биомакромолекулами описано применение комбинаций антител, специфичных к ЛФ, и меченных ферментом антивидовых антител или биотинилированного ЛФ и конъюгата стрептавидина с пероксидазой [8], а также сообщалось об использовании ЛФ, ацилированного по доступным остаткам лизина диангидридом диэтилентриаминпентауксусной кислоты и способного связывать 9 ионов европия на 1 молекулу ЛФ [10]. Конечно, прямое химическое мечение ЛФ дает продукт, упрощающий эксперимент по связыванию и обеспечивающий большую экспериментальную гибкость и возможность более правильной и точной количественной характеристики взаимодействия с гепарином. Мы в этом отношении решили пойти дальше, исключив химическое повреждение заряженной поверхности белковой глобулы органическими молекулами, и получили флуоресцентный рчЛФ за счет «биологически» внедренного иона редкоземельного металла в активный центр внутри третичной структуры белка [6]. Удельная интенсивность времязрешенной флуоресценции рчЛФ–Eu<sup>3+</sup>, хотя и меньшая, чем у конъюгата ЛФ с органическим комплексонатом Eu<sup>3+</sup> [10], была вполне достаточной для количественной оценки кинетики и равновесного состояния реакции связывания с гепарином.

*Кинетические характеристики и равновесные параметры связывания.* Количество рчЛФ–Eu<sup>3+</sup>, ассоциированного с гепарин–БСА, выходит на максимум практически сразу, в течение 1 мин после начала взаимодействия (рис. 2, а), и остается на плато с небольшими колебаниями (коэффициент вариации – 6 %) в течение суток. В литературе аналогичный результат был получен в гомогенной системе для комплексообразования между ЛФ и [3Н]гепарином [11]. Диссоциация гепаринового комплекса рчЛФ–Eu<sup>3+</sup> протекает на 74 % в первую минуту после внесения в систему 1000-кратного мольного избытка немеченного рчЛФ (рис. 2, а), и далее оставшееся количество связанного меченного белка медленно падает примерно в 3 раза в течение часа. Значит, связывание рчЛФ с гепарином является обратимым и насыщаемым. Похожий характер носит изученное нами ранее взаимодействие твердофазного рчЛФ с антителами в растворе, но в этом случае связывание достигает максимума лишь через 20 мин инкубации, и после примерно такого же промежутка времени выходит на плато реакция конкурентного ингибирования связывания за счет рчЛФ, внесенного в жидкую фазу [7].

При определении равновесной константы ассоциации ( $K_a$ ) использованы две концентрации конъюгата гепарин–БСА на твердой фазе: конъюгат иммобилизовался из растворов с содержанием 5,0 и 0,5 мг/л. Обработка экспериментальных данных и графические построения в координатах Скэтчарда показали, что углы наклона двух линеаризованных прямых почти одинаковы (рис. 2, б), значит, показатели правильности и точности расчета  $K_a$  для этих двух концентраций достоверно не отличаются, и для взаимодействия рчЛФ с гепарином  $K_a = 2,1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ .

Гораздо более высоким сродством характеризовалось связывание рчЛФ с поликлональными антителами в гетерофазной системе:  $1,5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$  [7]. Однако для систем белок–гликозаминогликан невысокое сродство является типичным, и, например, в случае комплекса авидин–гепарин  $K_a = 0,63 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  [12].

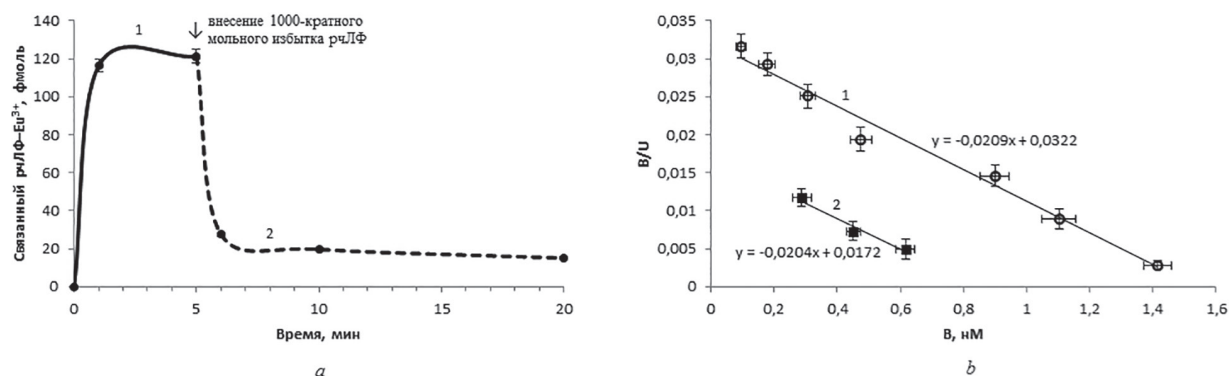


Рис. 2. Кинетика связывания комплекса рчЛФ–Eu<sup>3+</sup> с конъюгатом гепарин-БСА: 1 – ассоциация; 2 – диссоциация при внесении в систему 1000-кратного молярного избытка рчЛФ (а). Скэтчардовский график зависимости между концентрациями рчЛФ–Eu<sup>3+</sup>, связанного с гепарин-БСА на твердой фазе (В) и свободного в растворе (U) в состоянии равновесия в гетерофазной системе, где гепариновый конъюгат иммобилизовался из растворов с содержанием: 1 – 5,0 мг/л; 2 – 0,5 мг/л (b)

Fig. 2. The kinetics of rhLF–Eu<sup>3+</sup> complex binding to heparin-BSA conjugate: 1 – association; 2 – dissociation after adding of a 1000-fold molar excess of rhLF to the system (a). Scatchard plot of dependence between the concentrations of rhLF–Eu<sup>3+</sup> bound to heparin-BSA on the solid phase (B) and unbound in the solution (U) at equilibrium in the heterophase system, where the heparin conjugate was immobilized from solutions containing: 1 – 5.0 mg/L; 2 – 0.5 mg/L (b)

**Блокирующее действие рчЛФ на связывание вируса SARS-CoV-2 с конъюгатом гепарин-БСА.** Многочисленными исследованиями показано, что присутствующие на поверхности клеток человека гепарансульфат протеоглики (ГСП) играют роль первичных связывающих сайтов для разнообразных вирусов, облегчая их последующую рецепцию специализированными белками клеточной поверхности и интернализацию [13]. Так, в одной из основополагающих работ [14] найдено, что псевдовиром SARS как экспериментальная модель вируса SARS-CoV эффективно проникает в клетку при биохимически согласованном участии ГСП как участка прикрепления и ангиотензинпревращающего фермента 2 в качестве рецептора, причем в обеих стадиях участвует вирусный спайк-белок. Разрушение поверхностного гликозаминогликана гепариназой или добавление гепарина в систему клетка–вирус *in vitro* резко повышает устойчивость клетки к инфекции. Авторы обнаружили также, что ЛФ коров адсорбируется на клеточной поверхности, связываясь с ГСП, и блокирует первичное взаимодействие SARS с клеткой. В [13] коровий ЛФ, безопасная и коммерчески широкодоступная пищевая добавка, идентифицирован как эффективный противовирусный агент в отношении SARS-CoV-2 в трансформированных и в физиологически релевантных клетках человека. Исследователи показали, что природный ЛФ и холо-ЛФ (но не трансферрин) одинаково эффективно препятствуют заражению вирусом SARS-CoV-2 гепатоклеточной карциномы человека (Huh7), выбранной в качестве оптимальной линии для исследования эффектов различных коммерчески доступных фармсредств и биореагентов на коронавирусную инфекцию. Отмечается, что противовирусное действие ЛФ обусловлено нейтрализацией связывающей активности ГСП клетки в отношении SARS-CoV-2. При этом важно отметить, что у людей, инфицированных коронавирусом острого респираторного синдрома, экспрессия гена ЛФ повышается примерно в 150 раз по сравнению с нормой [14].

Эти интересные в научном отношении и важные для практики результаты побудили нас впервые исследовать индивидуальное и совместное с рчЛФ связывание вируса SARS-CoV-2 с твердофазным конъюгатом гепарин-БСА как моделью клеточного ГСП. Вирусные частицы вносили в два ряда лунок микропланшета с иммобилизованным конъюгатом, причем один из рядов был предварительно обработан раствором рчЛФ и содержал этот белок, специфически адсорбированный на гепариновых цепях конъюгата. После инкубации и промывок проводилось определение фона или выявление связанного вируса в лунках путем внесения нормальной сыворотки или антисыворотки к SARS-CoV-2 человека (каждая в двух разведениях) с последующей обработкой промытых лунок антивидовыми антителами, меченными пероксидазой, проведени-

ем ферментативной реакции и регистрацией колориметрического сигнала (рис. 3, *a*). В экспериментах использовались сыворотки Вu-1 человека, который не болел и не имел антител к корона-вирусу (контроль фона), и VL-1 человека, переболевшего ковид-19 и являющегося носителем антител класса G как к нуклеокапсидному, так и к спайковому белкам SARS-CoV-2.

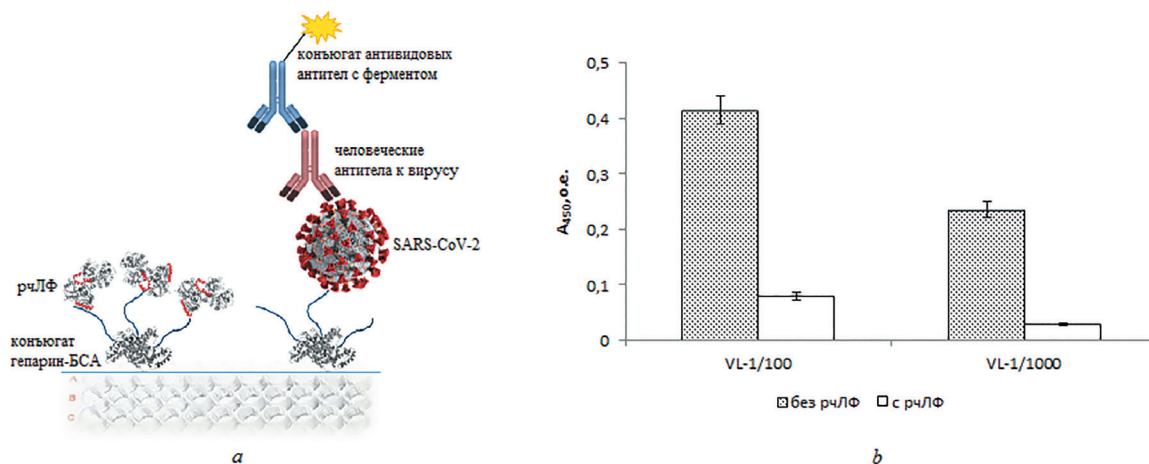


Рис. 3. Конструкция системы связывания (*a*) и результаты взаимодействия вируса SARS-CoV-2 с конъюгатом гепарин–БСА в отсутствие рчЛФ в системе и после обработки конъюгата белком рчЛФ (*b*)

Fig. 3. The scheme of the binding system (*a*) and the results of the interaction of the SARS-CoV-2 virus with heparin–BSA conjugate in the absence of rhLF in the system and after treatment of the conjugate with the rhLF protein (*b*)

На рис. 3, *b* представлены с вычетом фоновых значений результаты детекции вируса, связанного с конъюгатом гепарин–БСА, в контрольных и в обработанных раствором рчЛФ лунках. Видно, что рчЛФ ингибирует более чем на 80 % взаимодействие SARS-CoV-2 с гликозаминогликаном, т. е. структура исследованного препарата рчЛФ обладает целостностью и содержит в надлежащих местах макромолекулы, характерные для природного белка поверхностные катионные участки, обеспечивающие его активность по одному из механизмов антивирусной защиты.

**Заключение.** Многие функции природного ЛФ, жизненно необходимые или полезные для человека, обусловлены взаимодействиями периферических поверхностных участков третичной структуры этого белка, независимых от металлсвязывающих центров, с биологическими макромолекулами хозяина или инфицирующего агента. Поэтому в исследованиях, подготавливающих препарат рчЛФ к практическому применению, актуальной является задача установления структурной целостности и активности таких участков в рекомбинантном белке. Мы установили в препарате рчЛФ, имеющем статус производственного образца, наличие специфических положительно заряженных и экспонированных в раствор кластеров аминокислотных остатков по характеристикам их взаимодействия с биологическим полианионом на примере иммобилизованного гепарина – представителя гликозаминогликанов, моделирующего ГСП на поверхности клетки. В конъюгате гепарин–БСА, полученном путем восстановительного аминирования, углеводные цепи с многочисленными отрицательными зарядами ориентированы в раствор, а белковая часть обеспечивает прочную адсорбционную иммобилизацию в лунках пластмассового микропланшета. Добавляемый в жидкую фазу микропланшетной системы рчЛФ содержал ион  $\text{Eu}^{3+}$  в активном центре, детекция которого в связанном с гепарином белке осуществлялась измерением времени разрешенной флуоресценции. Связывание носит обратимый и насыщаемый характер, и рассчитанное значение равновесной константы ассоциации составляет  $2,1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ . Внесение в функционализированные лунки вирусных частиц SARS-CoV-2 приводило к их иммобилизации на конъюгате гепарин–БСА, поскольку коронавирусы способны прикрепляться к поверхности клетки-хозяина за счет зарядовых взаимодействий с клеточными ГСП, структурно родственными конъюгированному гепарину. В результате обработки конъюгата раствором рчЛФ связывание SARS-CoV-2 с гликозаминогликаном снижалось на 80 %.



Таким образом, обладающий металлсвязывающей активностью рчЛФ в форме комплекса с  $\text{Eu}^{3+}$  способен вступать в электростатические взаимодействия с биологическим полианионом за счет своей неповрежденной периферической структуры, включающей поверхностные катионные кластеры. Тест на взаимодействие рчЛФ– $\text{Eu}^{3+}$  с иммобилизованным конъюгатом гепарин–БСА может выполняться при разработке параметров качества рчЛФ в процессе его производства и подготовке к применению в качестве субстанции пищевых добавок и фармацевтических средств, а также в поиске комбинированных лекарств от коронавирусной инфекции.

### Список использованных источников

1. Борзенкова, Н. В. Лактоферрин: физико-химические свойства, биологические функции, системы доставки, лекарственные препараты и биологически активные добавки (обзор) / Н. В. Борзенкова, Н. Г. Балабушевич, Н. И. Ларионова // *Биофармацевтический журнал*. – 2010. – Т. 2, № 3. – С. 3–19.
2. Mann, D. M. Delineation of the glycosaminoglycan-binding site in the human inflammatory response protein lactoferrin / D. M. Mann, E. Romm, M. Migliorini // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269, N 38. – P. 23661–23667. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)31566-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)31566-1)
3. Goats producing biosimilar human lactoferrin / D. M. Bogdanovich [et al.] // *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. – 2021. – Vol. 848, N 1. – Art. 012080. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/848/1/012080>
4. Получение рекомбинантного лактоферрина человека из молока коз-продуцентов и его физиологические эффекты / В. С. Лукашевич [и др.] // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси*. – 2016. – Т. 60, № 1. – С. 72–81.
5. Антимикробные и антиоксидантные свойства апо-формы рекомбинантного человеческого лактоферрина, выделенного из молока коз-продуцентов / Р. Н. Бирюков [и др.] // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты*. – 2017. – Т. 9. – С. 305–317.
6. Некоторые металлсвязывающие свойства рекомбинантного лактоферрина человека из молока трансгенных коз / Д. А. Семенов [и др.] // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси*. – 2022. – Т. 66, № 1. – С. 43–54. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-43-54>
7. Семенов, Д. А. Новые иммуноаналитические системы на основе рекомбинантного лактоферрина человека / Д. А. Семенов, И. И. Вашкевич, О. В. Свиридов // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси*. – 2021. – Т. 65, № 3. – С. 290–302. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-3-290-302>
8. N-terminal stretch  $\text{Arg}^2$ ,  $\text{Arg}^3$ ,  $\text{Arg}^4$  and  $\text{Arg}^5$  of human lactoferrin is essential for binding to heparin, bacterial lipopolysaccharide, human lysozyme and DNA / P. H. C. van Berkel [et al.] // *Biochem. J.* – 1997. – Vol. 328, N 1. – P. 145–151. <https://doi.org/10.1042/bj3280145>
9. Hermanson, G. T. Bioconjugate techniques / G. T. Hermanson. – 3rd ed. – Academic Press, 2013. – P. 217–218. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-64240-9>
10. Direct detection of the binding of avidin and lactoferrin fluorescent probes to heparinized surfaces / W. C. Kett [et al.] // *Analytical Biochemistry*. – 2005. – Vol. 339, N 2. – P. 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.01.054>
11. Pejler, G. Lactoferrin regulates the activity of heparin proteoglycan-bound mast cell chymase: characterization of the binding of heparin to lactoferrin / G. Pejler // *Biochem. J.* – 1996. – Vol. 320, N 3. – P. 897–903. <https://doi.org/10.1042/bj3200897>
12. Avidin is a heparin-binding protein. Affinity, specificity and structural analysis / W. C. Kett [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2003. – Vol. 1620, N 1–3. – P. 225–234. [https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(02\)00539-1](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(02)00539-1)
13. Morphological cell profiling of SARS-CoV-2 infection identifies drug repurposing candidates for COVID-19 / C. Mirabelli [et al.] // *PNAS*. – 2021. – Vol. 118, N 36. – Art. e2105815118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2105815118>
14. Inhibition of SARS pseudovirus cell entry by lactoferrin binding to heparan sulfate proteoglycans / J. Lang [et al.] // *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 6, N 8. – Art. e23710. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023710>

### References

1. Borzenkova N. V., Balabushevich N. G., Larionova N. I. Lactoferrin: physical and chemical properties, biological functions, delivery systems, pharmaceutical and nutraceutical preparations (review). *Biofarmaceuticheskiy jurnal = Biofarmaceutical Journal*, 2010, vol. 2, no. 3, pp. 3–19 (in Russian).
2. Mann D. M., Romm E., Migliorini M. Delineation of the glycosaminoglycan-binding site in the human inflammatory response protein lactoferrin. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, vol. 269, no. 38, pp. 23661–23667. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)31566-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)31566-1)
3. Bogdanovich D. M., Radchikov V. F., Kuznetsova V. N., Petrushko E. V., Spivak M. E., Sivko A. N. Goats producing biosimilar human lactoferrin. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2021, vol. 848, no. 1, art. 012080. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/848/1/012080>
4. Lukashevich V. S., Budzevich A. I., Semak I. V., Kuznetsova V. N., Malyushkova E. V., Pyzh A. E., Novakovskaya S. A., Rudnichenko J. A., Popkov N. A., Ivashkevich O. A., Zalutsky I. V. Production of recombinant human lactoferrin from the milk of goat-producers and its physiological effects. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2016, vol. 60, no. 1, pp. 72–81 (in Russian).
5. Birukou R. N., Kastsiyanovich A. A., Kapustin M. A., Falkouskaya U. V., Chubarova H. S., Hubchik K. A. Antimicrobial and antioxidant properties of apoform of recombinant human lactoferrin isolated from goat milk. *Mikrobnye biotekhnologii:*

*fundamental'nye i prikladnye aspekty = Microbial biotechnologies: fundamental and applied aspects*, 2017, vol. 9, pp. 305–317 (in Russian).

6. Semenov D. A., Kuprienko O. S., Vashkevich I. I., Sviridov O. V. Some metal binding properties of recombinant human lactoferrin from the milk of transgenic goats. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2022, vol. 66, no. 1, pp. 43–54 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-43-54>

7. Semenov D. A., Vashkevich I. I., Sviridov O. V. New immunoassay systems based on recombinant human lactoferrin. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2021, vol. 65, no. 3, pp. 290–302 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-3-290-302>

8. Van Berkel P. H. C., Geerts E. J. M., van Veen A. H., Mericskay M., de Boer A. H., Nuijens J. H. N-terminal stretch Arg<sup>2</sup>, Arg<sup>3</sup>, Arg<sup>4</sup> and Arg<sup>5</sup> of human lactoferrin is essential for binding to heparin, bacterial lipopolysaccharide, human lysozyme and DNA. *Biochemical Journal*, 1997, vol. 328, no. 1, pp. 145–151. <https://doi.org/10.1042/bj3280145>

9. Hermanson G. T. *Bioconjugate techniques, Third Edition*. Academic Press, 2013, pp. 217–218. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-64240-9>

10. Kett W. C., Osmond R. I. W., Stevenson S. M., Moe L., Coombe D. R. Direct detection of the binding of avidin and lactoferrin fluorescent probes to heparinized surfaces. *Analytical Biochemistry*, 2005, vol. 339, no. 2, pp. 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.01.054>

11. Pejler G. Lactoferrin regulates the activity of heparin proteoglycan-bound mast cell chymase: characterization of the binding of heparin to lactoferrin. *Biochemical Journal*, 1996, vol. 320, no. 3, pp. 897–903. <https://doi.org/10.1042/bj3200897>

12. Kett W. C., Osmond R. I. W., Moe L., Skett S. E., Kinnear B. F., Coombe D. R. Avidin is a heparin-binding protein. Affinity, specificity and structural analysis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003, vol. 1620, no. 1–3, pp. 225–234. [https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(02\)00539-1](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(02)00539-1)

13. Mirabelli C., Wotring J. W., Zhang C. J., McCarty S. M., Fursmidt R., Pretto C. D., Qiao Y., Zhang Y., Frum T., Kadambi N. S., Amin A. T., O'Meara T. R., Spence J. R., Huang J., Alysandratos K. D., Kotton D. N., Handelman S. K., Wobus C. E., Weatherwax K. J., Mashour G. A., O'Meara M. J., Chinnaiyan A. M., Sexton J. Z. Morphological cell profiling of SARS-CoV-2 infection identifies drug repurposing candidates for COVID-19. *PNAS*, 2021, vol. 118, no. 36, art. e2105815118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2105815118>

14. Lang J., Yang N., Deng J., Liu K., Yang P., Zhang G., Jiang C. Inhibition of SARS pseudovirus cell entry by lactoferrin binding to heparan sulfate proteoglycans. *PLoS ONE*, 2011, vol. 6, no. 8, art. e23710. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023710>

## Информация об авторах

Семенов Дмитрий Александрович – науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: dsemenov@iboch.by.

Вашкевич Ирина Игнатьевна – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vashkevich@iboch.by.

Владыко Александр Станиславович – д-р мед. наук, гл. науч. сотрудник. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vladuko@belriem.by.

Свиридов Олег Васильевич – д-р хим. наук, заведующий лабораторией. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: sviridov@iboch.by.

## Information about the authors

Semenov Dmitry A. – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dsemenov@iboch.by.

Vashkevich Irina I. – Ph. D. (Chemistry), Leading Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vashkevich@iboch.by.

Vladyko Aleksandr S. – D. Sc. (Medicine), Chief Researcher. Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vladuko@belriem.by.

Sviridov Oleg V. – D. Sc. (Chemistry), Head of the Laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sviridov@iboch.by.