

Библиографические ссылки

1. Борзенкова Н.В., Балабушевич Н.Г., Ларионова Н.И. Лактоферрин: физико-химические свойства, биологические функции, системы доставки, лекарственные препараты и биологически активные добавки (обзор) // Биофармацевтический журнал. 2010. Т. 2, № 3. С. 3-19.
2. Лукашевич В.С., Будевич А.И., Семак И.В. и др. Получение рекомбинантного лактоферрина человека из молока коз-продуцентов и его физиологические эффекты // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. 2016. Т. 60, № 1. С. 72-81.
3. Majka G., Śpiwak K., Kurpiewska K. et al. A high-throughput method for the quantification of iron saturation in lactoferrin preparations // Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2013. Vol. 405, N 15. P. 5191-5200.

Семенов Д.А., Вашкевич И.И., Владыко А.С., Свиридов О.В. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ КОНКУРЕНТНОГО СВЯЗЫВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА И ВИРУСА SARS-CoV-2 С ГЕПАРАНСУЛЬФАТ ПРОТЕОГЛИКАНАМИ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ КОНКУРЕНТНОГО СВЯЗЫВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА И ВИРУСА SARS-CoV-2 С ГЕПАРАНСУЛЬФАТ ПРОТЕОГЛИКАНАМИ

Семенов Д.А.¹, Вашкевич И.И.¹, Владыко А.С.², Свиридов О.В.¹

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

²РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Лактоферрин (ЛФ) – это широко известный металлопротеин, относящийся к системе врожденного иммунитета и участвующий в биохимических процессах острой фазы воспаления. Кроме связывания и транспорта ионов железа, одной из многочисленных функций ЛФ является его активность против широкого спектра вирусов человека и животных [1]. Наиболее изученный механизм антивирусной активности заключается в предотвращении данным белком проникновения вирусных частиц в клетки-мишени. Многие вирусы имеют тенденцию связываться с олигосахаридной частью гепарансульфат протеогликана клеточной поверхности, и после первоначального прикрепления вирусная частица взаимодействует со специфическими рецепторами ACE2 и попадает внутрь клетки. В литературе описано, что ЛФ обладает способностью связываться с данными гликозаминогликанами на поверхности клеток, препятствуя адгезии и последующей интернализации вируса [2]. Взаимодействие ЛФ с анионными биополимерами, в частности с гликозаминогликанами, обусловлено наличием в природном белке кластера положительно заряженных аминокислотных остатков на N-конце макромолекулы.

Нашей целью было изучить ингибиторную активность ЛФ человека из молока трансгенных коз-продуцентов (рчЛФ) в отношении специфических взаимодействий вируса SARS-CoV-2 в модельной системе *in vitro* для того, чтобы подтвердить идентичность катионной структуры и противовирусной функции рекомбинантного белка характеристикам природного ЛФ.

Для этого реакцией восстановительного аминирования был синтезирован белковый конъюгат гепарина в качестве модели гепарансульфат протеогликанов клеточной мембраны. Данный подход позволил нам получить биологический объект, приближенный к природному способом присоединения неветвящихся углеводных цепей сульфатированных гликозаминогликанов, несущих отрицательный заряд, к коровому белку. Отметим, что коммерчески доступный гепарин отличается от гепарансульфата степенью сульфатирования углеводной цепи.

Для оценки конкурентного ингибирования связывания вируса SARS-CoV-2 с белковым конъюгатом гепарина в присутствии рчЛФ, синтезированный конъюгат был адсорбирован через белковую часть в лунках пластмассового микропланшета. После предварительной обработки иммобилизованного конъюгата раствором рчЛФ (10 мкг на лунку) вносили вирусные частицы, которые были отобраны в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии как потенциальный кандидат для получения белорусской вакцины от коронавируса, в количестве 100 нг. Образовавшийся на твердой фазе комплекс гепарина с вирусом выявляли путем последовательного внесения сыворотки человека, содержащей

антитела к вирусу, и антивидовых антител, меченных пероксидазой из корней хрена. Количество связавшегося фермента оценивали с помощью 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 здорового человека, не перенесшего COVID-19.

Выявлен блокирующий эффект рчЛФ на связывание вируса SARS-CoV-2 с иммобилизованным гепарин-белковым конъюгатом, имитирующим протеогликан на поверхности клетки-хозяина, который основан на сродстве рчЛФ к гликану. Предварительная обработка адсорбированного конъюгата раствором рчЛФ уменьшала примерно на 80% специфическое связывание вирусных частиц, внесенных в лунку. Полученные результаты позволяют, в частности, оценивать целостность структуры и активность рчЛФ в качестве субстанции пищевых добавок и фармацевтических средств и могут быть полезными в разработках комбинированных лекарств от коронавирусной инфекции.

Библиографические ссылки

1. Van der Strate B.W., Beljaars L., Molema G. et. al. Antiviral activities of lactoferrin // *Antiviral. Res.* 2001. Vol. 52, N 3. P. 225-239.
2. Mirabelli C., Wotring J.W., Zhang C.J. et. al. Morphological cell profiling of SARS-CoV-2 infection identifies drug repurposing candidates for COVID-19 // *PNAS*. 2021. Vol. 118, N 36, e2105815118. P. 1-12.