

УДК 571.27

Новый подход к созданию антиканцерогенных вакцин

А. Н. Глушков¹, С. В. Апалько^{1*}, М. Л. Филипенко^{1,2}, В. А. Матвеева^{1,2}, А. Ю. Бакулина¹, В. Г. Лунин³, М. В. Костяно^{1,4}

¹Учреждение Российской академии наук Институт экологии человека Сибирского отделения РАН, 650065, Кемерово, просп. Ленинградский, 10

²Учреждение Российской академии наук Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, 630090, Новосибирск, просп. Лаврентьева, 8

³Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

⁴Кемеровский государственный университет, 650043, Кемерово, ул. Красная, 6

*E-mail: apalko@ngs.ru

Поступила в редакцию 07.10.2010 г.

РЕФЕРАТ Воздействие определенных химических веществ (канцерогенов) на организм человека считается одним из главных этиологических факторов, приводящих к возникновению онкологических заболеваний. В представленной работе рассмотрен новый подход к созданию антиканцерогенных вакцин. Основная задача данного исследования состояла в получении пептида-иммуномиметика бензо[а]пирена, способного индуцировать специфические антиканцерогенные антитела, в качестве гаптен-специфического компонента антиканцерогенной вакцины. С этой целью синтезированы конъюгаты канцероген-белок, получены моно- и поликлональные антитела к бензо[а]пирену, при помощи технологии фагового дисплея осуществлен поиск пептида-иммуномиметика бензо[а]пирена и изучены его иммунологические свойства. Установлено, что структура пептида-иммуномиметика, позволяющая мимикрировать химические канцерогены группы полициклических ароматических углеводородов, возможна лишь в контексте рIII белка бактериофага M13. В связи с этим получен рекомбинантный белок, состоящий из пептида-иммуномиметика бензо[а]пирена и белка рIII. С помощью ИФА показано, что рекомбинантный белок специфически реагирует с моноклональными антителами В2 к бензо[а]пирену. При помощи молекулярного моделирования определена пространственная структура активного центра моноклональных антител В2 и проанализированы особенности его взаимодействия с полициклическими ароматическими углеводородами и, главным образом, с пептидом-иммуномиметиком бензо[а]пирена. Комплексный анализ результатов получения гаптен-специфического компонента антиканцерогенной вакцины позволил определить дальнейшую стратегию развития данного направления.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бензо[а]пирен, антиканцерогенные вакцины, пептид-иммуномиметик, фаговый дисплей, молекулярное моделирование.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ CBD – целлюлозосвязывающий домен; OD – оптическая плотность; АТ – антитела; БП – бензо[а]пирен; БСА – бычий сывороточный альбумин; ИФА – иммуноферментный анализ; МАТ – моноклональные антитела; ПАУ – полициклические ароматические углеводороды.

ВВЕДЕНИЕ

По данным ООН рак уносит ежегодно около 8 млн жизней. Эта неутешительная статистика привела к развитию нового терапевтического направления в онкологии – разработке противоопухолевых вакцин. К сожалению, такие вакцины обычно направлены на борьбу с уже возникшим заболеванием, а не с его причиной.

По данным ВОЗ, в 90% случаев возникновение рака обусловлено воздействием канцерогенов окру-

жающей среды. Основная часть этих канцерогенов (70–80%) – химические вещества, в том числе повсеместно распространенные полициклические ароматические углеводороды (ПАУ). Считается, что выявление соединений, обладающих канцерогенной активностью, и полное устранение их из сферы жизнедеятельности человека – эффективный путь профилактики опухолей. Однако в силу многих обстоятельств применение такого подхода практически невозможно. В связи с этим представляется необхо-

димым создание антиканцерогенной вакцины, способствующей повышению иммунологической защиты организма человека и животных от влияния химических канцерогенов.

Химические канцерогены, будучи низкомолекулярными соединениями, не способны сами по себе индуцировать иммунный ответ. В 1937 г. Creech и Franks впервые синтезировали конъюгаты канцерогенов с высокомолекулярными носителями – белками сыворотки животных. Они установили, что иммунизация животных такими конъюгатами активирует синтез специфических антиканцерогенных антител (АТ). Тогда же было обнаружено некоторое угнетение развития опухолей, индуцированных канцерогенами, после предварительной иммунизации, и впервые высказана идея о возможном применении такого подхода к предупреждению раковых заболеваний у человека [1].

Следующий шаг в разработке антиканцерогенных вакцин сделали Moolten и соавт. в 1981 г. Они конъюгировали с белком не канцероген, а его структурный аналог, не обладающий способностью индуцировать опухоль. Предварительная иммунизация животных таким конъюгатом значительно снижала возникновение опухолей под воздействием явного канцерогена [2].

Принципиально новый подход использовали Chagnaud и соавт. В 1992 г. они сообщили о получении моноклонального антиидиотипического АТ к бензо[а]пирену (БП). Вторые, антиидиотипические АТ несут в себе «внутренний образ» канцерогена и способны индуцировать синтез первых АТ к канцерогену без использования конъюгатов канцероген-белок. В 1993 г. они описали ингибирующее действие вторых антител на возникновение химически индуцированных опухолей [3].

Начиная с середины 1980-х гг. Silbart и соавт. сконцентрировали свои усилия на индукции специфических секреторных АТ в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта и бронхолегочной системы путем комбинации конъюгатов канцероген-белок с различными адъювантами для создания барьера на пути канцерогена из окружающей среды внутрь организма. В обзорной статье 1997 г. Silbart прямо ставит вопрос о будущем применении антиканцерогенных вакцин у человека [4].

Учитывая то, что препараты конъюгатов канцерогенов или их аналогов с белками-носителями могут приводить к ятрогенной индукции опухолей, а введение антиидиотипических АТ – вызывать аллергические и аутоиммунные заболевания, предложенные подходы неприменимы для создания антиканцерогенных вакцин для человека и животных.

Мы предлагаем принципиально новый подход к созданию антиканцерогенной вакцины. В качестве гаптен-специфического компонента предполагает-

ся использовать пептид, способный индуцировать специфические антиканцерогенные АТ. В связи с тем, что БП является одним из самых активных и распространенных в окружающей среде соединений группы ПАУ, а также безусловным канцерогеном для человека, основная цель исследования состояла в получении пептида-иммуномиметика БП.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез конъюгатов

Конъюгаты ПАУ-белок: конъюгаты БП, бенз[а]антрацена, антрацена, хризена, пирена (Aldrich, Германия) синтезировали методом ковалентного связывания альдегидной группы гаптена с аминоклассами белка-носителя, в качестве которого использовали либо бычий сывороточный альбумин (БСА), либо гексокиназу [5].

Конъюгаты пептид-кБСА: к 700 мкл раствора, содержащего 2 мг катионизированного БСА (кБСА) [6], добавляли 2 мг синтетического пептида и 10 мг 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимидгидрохлорида (EDC), инкубировали в течение 2 ч, а затем проводили диализ раствора против H₂O (1 л) в течение 24 ч с шестикратной сменой воды.

Иммунизация лабораторных животных

Получение гибридомы, продуцирующей мАТ, специфичное к БП: гибридомы получали посредством слияния клеток мышинной миеломы Sp2/0 и спленоцитов самок мышей линии Balb/c, иммунизированных конъюгатом БП-БСА [7], по протоколу, описанному Kohler G. и Milstein C. [8].

Получение поликлональных АТ к БП: кроликов иммунизировали 2 мг конъюгата БП-БСА внутримышечно еженедельно в течение 3 недель. Первую иммунизацию проводили в смеси с полным адъювантом Фрейнда (Sigma, США), вторую – антигеном с неполным адъювантом Фрейнда, а заключительную – антигеном в забуференном физиологическом растворе. Затем каждые 2 недели проводили поддерживающие инъекции. Кровь забирали через 2 мес. после начала иммунизации 1 раз в 2 недели.

Иммунизация животных химерным белком, содержащим пептид-иммуномиметик БП: мышей линии Balb/c иммунизировали внутрибрюшинно препаратом химерного белка четырехкратно через каждые 2 недели. Первую иммунизацию проводили антигеном в смеси с полным адъювантом Фрейнда, последующие антигеном с неполным адъювантом Фрейнда. Количество вводимого антигена составляло 100–150 мг. Начиная с первой иммунизации, сыворотку крови мышей тестировали на присутствие специфических АТ к ПАУ.

Аффинную очистку АТ к БП проводили при помощи аффинной хроматографии на колонках ПАУ-гексокиназа-сефароза 4В [9]. Смена белка-носителя в составе конъюгата позволяла избежать предварительной очистки антисыворотки от сопутствующих АТ против белка-носителя, используемого при иммунизации (АТ против БСА).

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Для выявления специфических АТ к ПАУ-БСА лунки полистирольных планшетов (Медполимер, Россия) сенсibilизировали 100 мкл конъюгата ПАУ-БСА (5 мкг/мл) в течение 12 ч при 4°C. Участки неспецифического связывания насыщали 0.5% раствором БСА в основном фосфатном буфере (PBS: 8 г NaCl, 0.2 г KCl, 2.68 г Na₂HPO₄ × 7H₂O, 0.24 г KH₂PO в 1 л воды, pH 7.2–7.4), после чего лунки инкубировали в течение 1 ч при 37°C со 100 мкл сыворотки крови иммунизированных животных, разведенных в PBS, содержащем 0.05% Tween-20 (PBST) и 0.5% БСА. Несвязавшийся материал удаляли с помощью PBST и PBS. Связавшиеся АТ выявляли конъюгатом АТ против суммарных Ig мыши с пероксидазой хрена (ЗАО «БИОСАН», Новосибирск), с последующим окрашиванием субстратным раствором ТМВ (Fluka, Швейцария). Оптическую плотность (OD) измеряли на микропланшетном ридере (ФФМ, Россия) при 450 нм.

Для выявления специфического связывания химерного белка с АТ к БП лунки полистирольных планшетов сенсibilизировали моно- или поликлональными АТ к БП (5 мкг/мл). После блокировки вносили по 100 мкл химерного белка, разведенного до нужной концентрации PBST с 0.5% БСА. После инкубации планшеты тщательно отмывали, а затем вносили по 100 мкл кроличьей сыворотки против целлюлозосвязывающего домена (CBD) с последующей инкубацией, после чего связавшиеся рекомбинантные белки выявляли конъюгатом АТ против IgG кролика с пероксидазой хрена как описано выше. Для оценки воспроизводимости результатов эксперимент повторяли 3 раза.

Конкурентный ИФА: лунки полистирольных планшетов сенсibilизировали конъюгатом БП-БСА (5 мкг/мл). После блокировки в лунки вносили смесь мАТ В2 постоянной концентрации с разным количеством конкурента (ПАУ или синтетических пептидов). Смесь мАТ В2 с конкурентом перед внесением в лунки инкубировали в течение 30 мин с мягким покачиванием при 37°C, общий объем смеси составлял 100 мкл. Все анализируемые образцы разбавляли PBST с 0.5% БСА. Планшеты инкубировали в течение 1 ч с мягким покачиванием при 37°C. После тщательной отмывки планшета PBST связавшиеся мАТ выявляли

конъюгатом АТ против IgG мыши с пероксидазой хрена как описано выше. Для оценки воспроизводимости результатов эксперимент повторяли 3 раза.

Процедуру аффинной селекции фаговой пептидной библиотеки проводили в соответствии с протоколом, прилагаемом к набору Ph.D-12™ (New England BioLabs) с дополнительными модификациями [10].

Химический синтез пептидов методом активированных эфиров в растворе выполнен в лаборатории органического синтеза ИХБФМ СО РАН.

Молекулярное моделирование

Оптимальные шаблоны для моделирования структуры АТ по гомологии подобраны с помощью сервера BLAST. Моделирование проводили в программе Modeller9v1. Молекулярный докинг осуществляли в программе AutoDock версии 4.0. Для построения модели пептида в составе белка рIII, использовали программу моделирования *de novo* Rosetta [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез конъюгатов ПАУ-белок для получения и анализа антител

Существенным недостатком известных методов конъюгации ПАУ-белок, в том числе и метода получения конъюгатов БП-белок, было образование в конечном продукте полимерных продуктов, что существенно уменьшало выход растворимой фракции и, как следствие, делало такой конъюгат непригодным для иммуноанализа. Поэтому основной задачей данного блока исследования стало получение хорошо растворимых конъюгатов гаптен-белок, содержащих минимальные количества полимерных продуктов, и устойчивых без специальных стабилизаторов.

Мы применили метод ковалентного связывания гаптена с белком, заключающийся в образовании азометиновой связи между альдегидной группой гаптена и аминокруппами белка [5]. Использование альдегида БП для синтеза конъюгатов с белками позволило достичь хороших результатов – получены сыворотки животных с высокими титрами АТ к БП. При этом иммунизация гаптенем на основе одного белка-носителя, например БСА, и последующее выявление АТ к этому же гаптenu на основе другого белка-носителя, например гексокиназы, оказалось высокоэффективным для анализа АТ к БП в прямом и конкурентном ИФА, а также для получения аффинно-очищенных АТ к ПАУ в одну стадию [9].

Получение и иммунохимическая характеристика моноклонального антитела к бензо[а]пирену

В настоящее время в мире имеется несколько мАТ против БП (США, Чехия, Япония), созданных, глав-

ным образом, с целью разработки тест-систем ИФА для выявления загрязняющих агентов группы ПАУ в среде и их метаболитов и аддуктов с ДНК в биологических жидкостях человека и животных [12–14]. Основным недостатком таких мАТ в случае получения гаптен-специфического компонента вакцины – недостаточная специфичность их связывания с БП по сравнению с неканцерогенными ПАУ. Кроме того, не изучена способность зарубежных мАТ связываться с гидрофобными эндобиотиками (стероидными гормонами) и ароматическими аминокислотами. Поэтому ключевым этапом настоящей работы стало получение высокоспецифичного мАТ к БП и анализ его перекрестного реагирования с другими соединениями группы ПАУ, стероидными гормонами и ароматическими аминокислотами.

Из полученных в результате гибридизации клонов мышинных гибридом был выбран клон В2, продуцирующий мАТ класса IgG, которое не взаимодействовало с конъюгатом антрацен-БСА, слабо взаимодействовало с конъюгатами хризен- и пирен-БСА. Наиболее эффективно мАТ В2 связывалось с БП и с бенз[а]антраценом, вероятным канцерогеном человека [7].

Исходя из предположения о том, что присутствие ароматического кольца является одним из условий взаимодействия АТ против ПАУ с другими соединениями, мы проверили возможность перекрестной реакции мАТ В2 с такими аминокислотами, как триптофан и фенилаланин. Известно, что в передаче сигнала от ПАУ и эндогенных субстратов, таких, как эстрогены, участвует один рецептор (aryl hydrocarbon receptor), поэтому изучили также перекрестное реагирование мАТ В2 с эстрогенами и не выявили связывания мАТ В2 с указанной группой соединений, это исключает вероятность получения антиканцерогенной вакцины с такими нежелательными побочными эффектами, как индукция аутоиммунных реакций против эндогенных лигандов.

Получение и характеристика пептида-иммуномиметика бензо[а]пирена

Для поиска пептида-иммуномиметика БП мы использовали технологию фагового дисплея. Процедура аффинной селекции включала инкубацию исходной библиотеки Ph.D-12™ с моно- и поликлональными АТ к БП, отмывку несвязавшихся и элюцию связавшихся с АТ бактериофагов. При этом предварительную процедуру истощения бактериофагов на интактных IgG мыши или кролика заменяли перекрестным картированием АТ в третьем раунде селекции, т.е. первые два раунда проводили на одновидовых АТ, например на мАТ В2, а в третьем раунде полученной популяцией бактериофагов картировали поликлональные АТ к БП, и наоборот. К тому же предложен-

ный подход должен был способствовать селекции высокоаффинных клонов бактериофагов.

В результате было получено пять клонов бактериофагов, специфически взаимодействующих с мАТ В2. При этом четыре клона получили в результате перекрестной селекции, когда два первых раунда проводили на мАТ В2, а последний на поликлональных АТ к БП; и один, когда все раунды селекции проводили на мАТ В2. Результаты секвенирования ДНК этих клонов с последующей трансляцией показали, что все пять клонов имели одинаковую аминокислотную последовательность рекомбинантного пептида – LeuHisLeuProHisHisAspGlyValGlyTrpGly [10, 15].

Для изучения иммунохимических свойств пептида-иммуномиметика БП был осуществлен его синтез (последовательность пептида условно обозначена PiP). В связи с тем, что сначала синтезировали половинки пептида, LeuHisLeuProHisHis (LH-пептид) и AspGlyValGlyTrpGly (DG-пептид), которые затем сшивали, оценивали также способность LH- и DG-пептидов специфически взаимодействовать с мАТ В2.

Предполагается, что структурная мимикрия ПАУ зависит от присутствия в составе пептида остатка триптофана, поэтому триптофан использовали в качестве отрицательного контроля.

Было установлено, что синтетические образцы пептидов конкурируют за связывание мАТ В2 с конъюгатом БП-БСА. Однако сила их связывания значительно ниже, чем у БП. Вместе с тем триптофан (Trp) не показал явной конкуренции за связывание с мАТ В2 (рис. 1). Это говорит о том, что Trp способен специфически связываться с АТ против химических канцерогенов группы ПАУ лишь в контексте с другими аминокислотными остатками данных пептидов.

Загадкой остается природа связывания LH-пептида с мАТ В2. Можно предположить, что взаи-

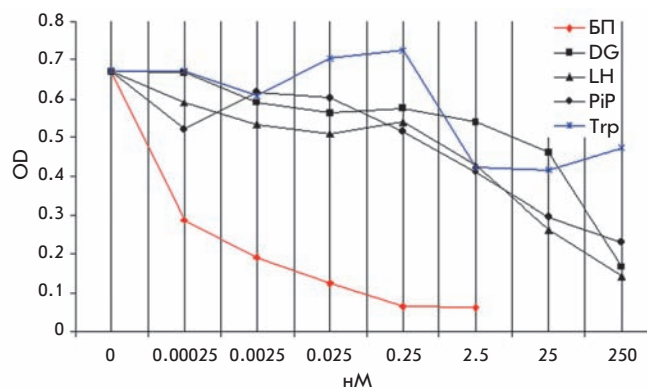


Рис. 1. Конкурентное ингибирование БП, DG, LH, PiP и Trp связывания мАТ В2 с иммобилизованным конъюгатом БП-БСА.

модействие пептида Р1Р с мАТ В2 носит сложный характер и не объясняется структурной мимикрией БП триптофаном или каким-то другим гидрофобным остатком.

Анализ сыворотки мышей, иммунизированных конъюгатами пептидов с кБСА, выявил присутствие АТ к бенз[а]антрацену и антрацену. Однако их уровень был на порядок ниже уровня АТ к ПАУ, индуцированных при иммунизации мышей БП-БСА [11].

В некоторых работах по получению пептидомиметиков низкомолекулярных соединений отмечается, что исходная конформация пептидов, презентруемых на поверхности несущего белка бактериофага, может изменяться в свободном пептиде и при любой дополнительной модификации. Такие изменения критичны для распознавания пептида АТ [16].

Поэтому нами с помощью программы Rosetta была построена модель пептида в составе белка рIII бактериофага М13. В модели боковой радикал триптофана оказался экспонированным на поверхности белка [11]. Вероятно, структура пептида-иммуномиметика, позволяющая мимикрировать химические канцерогены группы ПАУ, возможна лишь в контексте белка рIII. В связи с этим дальнейшая работа была направлена на получение рекомбинантного белка, состоящего из пептида-иммуномиметика БП и белка рIII бактериофага.

Получение и характеристика рекомбинантного белка, содержащего пептид-иммуномиметик бензо[а]пирена

Существует несколько генно-инженерных подходов, позволяющих повысить уровень экспрессии и стабильность чужеродных белков в бактериальной системе, облегчить процедуру тестирования и увеличить эффективность системы очистки данных белков. Один из них – fusion-технология – технология слитых (химерных) белков. Она основана на соединении в одной рамке трансляции двух генов (гена антигенного компонента и гена белка-носителя), что приводит к синтезу химерного белка в бактериальной системе [17].

С использованием fusion-технологии нами получен и охарактеризован химерный белок, антигенный компонент которого состоял из аминокислотных последовательностей пептида-иммуномиметика БП и белка рIII бактериофага М13, на основе которого сконструирована библиотека Ph.D-12™. В качестве белка-носителя использовали CBD-домен эндогликаназы *Anaerocellum thermophilum*, способный аффинно взаимодействовать с целлюлозным сорбентом, что позволило в одну стадию выделить и очистить рекомбинантный белок, содержащий пептид-иммуномиметик.

Методом неконкурентного ИФА изучили способность полученного химерного белка, состоящего из антигенного компонента (пептид-иммуномиметик БП в составе белка рIII) и белка-носителя (CBD), взаимодействовать с мАТ В2. В качестве отрицательного контроля использовали CBD. Установлена дозовая зависимость способности химерного белка, содержащего пептид-иммуномиметик, специфически связываться с адсорбированными на пластике мАТ В2 (рис. 2). При этом химерный белок не связывался с поликлональными мышиными и кроличьими АТ к БП.

Для выяснения того, способен ли пептид-иммуномиметик в составе рIII бактериофага индуцировать АТ против ПАУ, мышей линии Balb/c иммунизировали внутрибрюшинно химерным белком. В сыворотке крови иммунизированных мышей обнаружен низкий уровень АТ к ПАУ. Наиболее выраженным было связывание АТ с антраценом. В то же время в сыворотке крови мышей, иммунизированных рекомбинантным клоном бактериофага, содержащим в составе белка рIII пептид-иммуномиметик БП, обнаружены АТ к БП в титрах, сопоставимых с титрами в положительном контроле – иммунизация конъюгатом БП-БСА [10, 15].

Чтобы определить пути повышения иммуногенности химерного белка по отношению к БП при помощи молекулярного моделирования изучили пространственную структуру активного центра мАТ В2 и особенности его взаимодействия с ПАУ и с пептидом-иммуномиметиком.

Особенности взаимодействия мАТ В2 с пептидом-иммуномиметиком бензо[а]пирена

По установленным первичным структурам тяжелой и легкой цепей методом моделирования по гомологии была построена модель Fab-фрагмента мАТ В2. Средняя энергия связывания Fab-фрагмента мАТ В2 с рядом ПАУ, вычисленная с помощью программы молекулярного докинга, коррелировала с экспериментальными данными о перекрестной реактивности

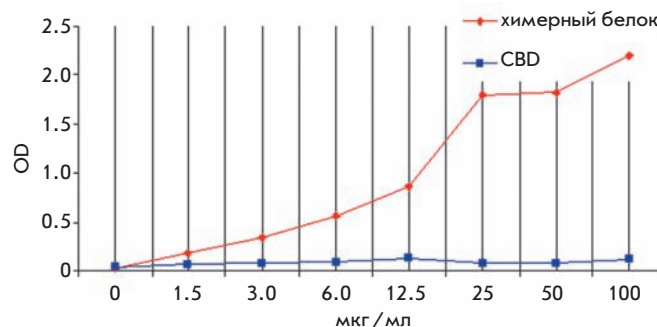


Рис. 2. Связывание химерного белка, содержащего пептид-иммуномиметик бензо[а]пирена, с мАТ В2.

сти мАТ В2 с этими же ПАУ, что подтверждает правильность построенной модели [11].

Методом молекулярного докинга определена возможность существования двух карманов в активном центре мАТ В2 для связывания ПАУ. При этом наилучшая позиция для связывания БП и ряда других ПАУ находилась между третьими петлями легкой и тяжелой цепей мАТ В2 (этот карман условно назван К1). Найдено два варианта расположения БП в кармане К1 – вертикальное и горизонтальное, первое и второе соответственно. Второй карман, находящийся между второй петлей легкой цепи и третьей петлей тяжелой цепи, был менее глубоким и, исходя из предсказанной докингом большей энергии связи, менее предпочтительным для связывания ПАУ (этот карман условно назван К2) [11].

С целью моделирования взаимодействия пептида LeuHisLeuProHisHisAspGlyValGlyTrpGly с мАТ В2 сделан ряд молекулярных докингов Fab-фрагмента мАТ В2 с трипептидами, составляющими РiР. Ни один из трипептидов не связался с АТ в районе первого кармана. Несколько трипептидов (HisLeuPro, LeuProHis, ProHisHis и GlyTrpGly) связались с АТ в районе второго кармана (рис. 3). При этом три трипептида объединяет присутствие незакрытого другими аминокислотами остатка гистидина. Это объясняет способность ЛН-пептида конкурировать за связывание мАТ В2 с конъюгатом БП-БСА.

В то же время очевидно, что триптофан, входящий в состав пептида-иммуномиметика БП, играет ключевую роль в связывании с мАТ В2 при условии его экспонирования на поверхности белка. Такая структура пептида-иммуномиметика возможна в составе белка рIII.

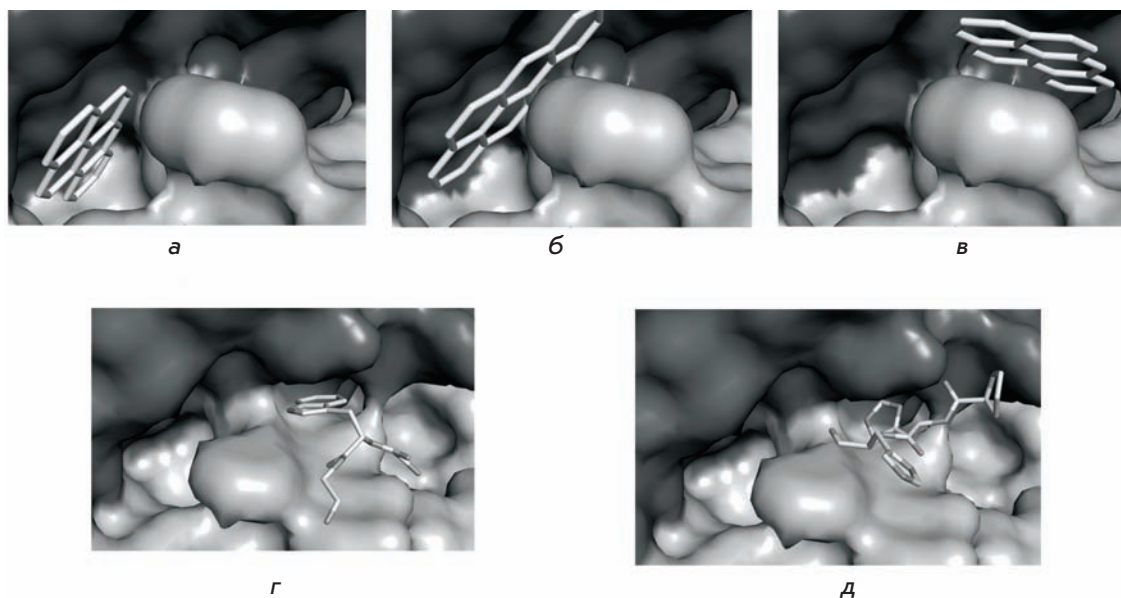
Если признать существование второго кармана связывания в активном центре мАТ В2, то можно объяснить и тот факт, что химерный белок, содержащий пептид-иммуномиметик, активно связывается только с мАТ В2, но не с другими, поликлональными, АТ к БП.

Скорее всего в процессе селекции рекомбинантных бактериофагов на мАТ В2 отбор пептидов шел по связыванию со вторым карманом, как с наиболее предпочтительным. Возможно, что исходная библиотека не содержала пептида, способного к специфическому связыванию с более глубоким первым карманом. На это указывает и то, что в популяции рекомбинантных бактериофагов, полученных в результате аффинной селекции на поликлональных АТ, не найдено клонов, способных к специфическому связыванию с мАТ В2, а также то, что все пять клонов имели одинаковую аминокислотную последовательность.

Выявленную в результате экспериментов *in vivo* слабую реверс-мимикрию, т.е. слабую иммунную реакцию с ПАУ АТ при иммунизации мышей химерным белком, можно объяснить следующим.

Как отмечено выше, из всех боковых радикалов аминокислот наибольшим структурным сходством с БП обладает боковой радикал триптофана. Наложение структур триптофана и БП в первом положении кармана К1 показывает, что в составе полипептидной цепи триптофан не может связаться с такой глубокой полостью, так как длина БП превышает длину бокового радикала триптофана. В то же время во втором положении кармана К1 возможна структурная мимикрия БП триптофаном в сочетании с каким-либо другим боковым радикалом аминокислотного остатка. Возможно, что часть АТ, индуцированных при иммунизации

Рис. 3. Докинг связывания мАТ В2 с БП, GlyTrpGly и ProHisHis. а – Связывание БП по первому положению в кармане К1. б – Связывание БП по второму положению в кармане К1. в – Связывание БП в кармане К2. г – Связывание GlyTrpGly в кармане К2. д – Связывание ProHisHis в кармане К2.



пептидом-иммуномиметиком, имеют полость для связывания по типу кармана K2, поэтому АТ, связывающие триптофан, в общем случае не будут связывать БП. Другая часть АТ может иметь полость для связывания по типу второго положения кармана K1, что позволяет им связывать ПАУ, в том числе и БП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование конъюгатов химических канцерогенов (или их структурных аналогов) с макромолекулярными носителями в качестве вакцин для иммунопрофилактики злокачественных новообразований у человека абсолютно недопустимо ввиду риска индукции опухоли самим препаратом вакцины. Гибридная технология получения антиидиотипических АТ имеет ограничения в оптимизации иммуногенных свойств искомым вакцин, она сложная и дорогая.

Предлагаемый подход, а именно, получение пептидов-иммуномиметиков химических канцерогенов с помощью технологии фагового дисплея более предпочтителен.

Полученные нами МАТ В2 обладают высокой специфичностью к БП, низкой перекрестной реактивностью с неканцерогенными ПАУ, не реагируют с эндобиотиками. Более того, методом молекулярного докинга показано, что предсказанная средняя энергия связывания молекулы дибензо[а]пирена с моделью Fab-фрагмента МАТ В2 составляет -8.91 ккал/моль, что превышает эти значения как для БП, так и других ПАУ. Нами обнаружена прямая корреляция между предсказанной энергией связывания и экспериментально измеренной перекрестной реактивностью ПАУ. На этом основании можно предположить, что использование МАТ В2 в технологии фагового дисплея окажется эффективным при поиске пептидов-иммуномиметиков не только БП, но и других ПАУ с более высокой канцерогенной активностью.

Стоит отметить, что моноклональные антиидиотипические АТ были получены при иммунизации животных поликлональными АТ к БП [3]. В связи с этим дальнейшая стратегия предлагаемого нами подхода будет определяться использованием новых молекул-мишеней для поиска пептидов-иммуномиметиков ПАУ. Наиболее удачным, на наш взгляд, кажется использование в качестве молекулы-мишени рекомбинантного Fab-фрагмента МАТ В2 с удаленным при помощи точечного мутагенеза вторым карманом. Полученные в результате селекции на таком АТ рекомбинантные бактериофаги обязательно должны проверяться на связывание с поликлональными АТ к БП.

Вторым направлением повышения иммуногенности искомым вакцин по отношению к канцерогенным ПАУ станет использование других фаговых библиотек и/или оптимизация структуры рекомбинантного пептида путем точечных мутаций. Это позволит получить пептид, способный индуцировать высокоспецифичный иммунный ответ к БП и более канцерогенным ПАУ. ●

Авторы выражают благодарность за помощь в работе Е.А. Храпову, Л.Э. Матвееву, А.М. Ляцуку, В.Н. Сильникову, Е.А. Шериной, А.В. Аверьянову. Особую благодарность за поддержку и помощь в развитии данного направления авторы выражают академику Д.Г. Кнорре.

Работа выполнена при поддержке Государственного контракта (02.512.12.2044) в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 10-04-98003).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Creech H.J., Oginsky E.L., Tryon M. // Cancer Res. 1947. V. 7. P. 301–304.
2. Moolten F.L., Schreiber B., Rizzone A. // Cancer Res. 1981. V. 41. P. 452–459.
3. Chagnaud J.L., Faiderbe S., Geffard M. // Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie. 1993. V. 316. P. 1266–1269.
4. Silbart L.K., Rasmussen M.V., Oliver A.R. // Vet. Hum. Toxicol. 1997. V. 39. № 1. P. 37–43.
5. Костянко М.В., Глушков А.Н. Патент № 2141114, РФ, 6 G 01 N 33/50, 1998.
6. Muckerheide A., Apple Raimond J., Pesce Amadeo J., Michale Gabriel J. // J. Immunol. 1987. V. 138. P. 833–837.
7. Глушков А.Н., Апалько С.В., Матвеева В.А., Костянко М.В., Черно С.В. // Росс. иммунол. журн. 2009. Т. 3. № 12. С. 30–38.
8. Kohler G., Milstein C. // Nature. 1975. V. 256. P. 495–497.
9. Glushkov A.N., Kostyanko M.V., Chernov S.V., Vasilchenko I.L. // Russian J. Immunology. 2002. V. 7. P. 41–46.
10. Глушков А.Н., Апалько С.В., Филипенко М.Л., Матвеева В.А., Храпов Е.А., Костянко М.В. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2008. Т. 3. С. 32–36.
11. Глушков А.Н., Апалько С.В., Бакулина А.Ю., Матвеева В.А., Храпов Е.А., Костянко М.В., Сильников В.Н., Филипенко М.Л. // Молекуляр. биология. 2010. Т. 44. С. 699–707.
12. Gomes M., Santella R.M. // Chem. Res. Toxicol. 1990. V. 3. P. 307–310.
13. Scharnweber T., Fisher M., Suchanek M., Knopp D., Niessner R. // Fresenius J. Anal. Chem. 2001. V. 371. P. 578–585.
14. Yamashita N., Nishama S. United State Patent № US 6,277,964 B1, 2001.
15. Глушков А.Н., Апалько С.В., Филипенко М.Л., Матвеева В.А., Храпов Е.А., Костянко М.В. Патент № 2357975, РФ, C07K 16/42, A61K 38/04, C12P 21/03, 2009.
16. Böttger V., Peters L.-E., Micheel B. // J. Mol. Recognit. 1999. V. 12. P. 191–197
17. Terpe K. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 60. P. 523–533.