



УДК 577.112.6:547.458.34.083.3:678.745.842

**ИСКУССТВЕННЫЕ ПЕПТИДНЫЕ И УГЛЕВОДНЫЕ АНТИГЕНЫ.  
ИММОБИЛИЗАЦИЯ ГАПТЕНОВ И АДЪЮВАНТА (МДП)  
НА ПОЛИАКРИЛАМИДЕ****Юровский В. В., Бовин Н. В., Сафонова Н. Г.,  
Василов Р. Г., Хорлин А. Я.***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

С целью изучения влияния полиакриламидного носителя на иммуногенные свойства пептидных и олигосахаридных гаптенов на этом носителе были иммобилизованы в одном случае гексапептид, гомологичный последовательности 95–100 тяжелой цепи H-2D<sup>b</sup>-антигена гистосовместимости мыши, а в другом случае — олигосахаридная антигенная детерминанта системы групп крови Льюдса, Le<sup>a</sup>. Кроме того, были приготовлены конъюгаты, содержащие помимо указанных гаптенов еще N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамин (МДП) — синтетический адъювант гликопептидной природы. В результате иммунизации мышей линии BALB/c приготовленными конъюгатами были получены антисыворотки против соответствующих гаптенов. Твердофазным иммуноферментным анализом показано, что антисыворотки имеют высокий титр (до 10 000) связывания с соответствующими гаптенами, причем МДП, иммобилизованный на том же носителе, что и гаптен, обладает значительной иммуностимулирующей активностью. Таким образом, продемонстрирована принципиальная возможность использования полиакриламидного носителя для создания иммуногенных препаратов на основе гаптенов пептидной и олигосахаридной природы.

В последние годы синтетические антигенные детерминанты (пептиды и олигосахариды) широко используются для целенаправленного получения антител с заданной специфичностью [1, 2]. Благодаря известной специфичности такие антитела могут применяться в качестве структурных зондов для изучения антигенной структуры и топографии белков и гликопротеинов и анализа молекулярных механизмов их функционирования. Как правило, сами антигенные детерминанты (как и гаптены) не вызывают образования антител; для развития эффективного гуморального ответа они должны быть конъюгированы с молекулами-носителями, роль которых заключается в создании оптимальной плотности антигенных детерминант (для прямой стимуляции В-клеток [3]) или в активации Т-хелперов [4]. Наиболее распространенными молекулами-носителями являются белки и полисахариды [5, 6]. Однако при использовании этих молекул возникает ряд трудностей. Во-первых, они сами содержат большое количество антигенных детерминант, иммуногенность которых нередко превосходит иммуногенность конъюгированных детерминант. Во-вторых, не всегда удается контролировать состав полученных конъюгатов. Поэтому представляет интерес использование в качестве носителей неиммуногенных полимеров, дающих возможность создавать заданную плотность антигенных детерминант. В качестве таких носителей предлагаются полиакриловая кислота [7, 8], поливинилпиридин [8], двойные спирали комплементарных полинуклеотидов [9] и др. Для усиления ответа используют синтетические адъюванты — N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамин (МДП) или его аналоги [10, 11].

Данная работа посвящена использованию полиакриламида в качестве носителя для синтетических пептидного (фрагмент антигена гистосовместимости мыши H-2D<sup>b</sup>) и олигосахаридного (антигенная детерми-

Сокращения: ГП — гексапептид Leu-Gln-Gln-Leu-Ser-Gly; МДП — N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамин; БСА — бычий сывороточный альбумин; KLH — гемоцианин моллюска фиссуреллы.

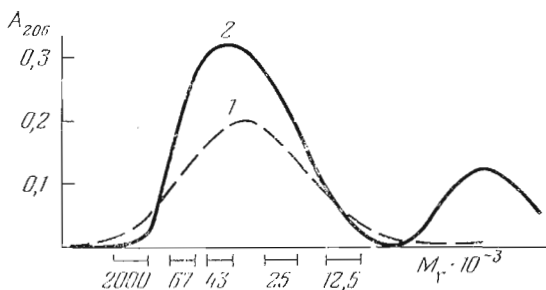


Рис. 1. Гель-фильтрация на сефадексе G-100 конъюгатов ГП-ПАА (1) и ГП-ПАА-МДП (2). В качестве стандартов использовались голубой декстран, БСА, овальбумин, химо-трипсиноген и цитохром с

нанта системы групп крови Льюиса,  $Le^a$ ) гаптенов при получении анти-тел с заданной специфичностью.

На полиакриламидном носителе были иммобилизованы в одном случае гексапептид (ГП), гомологичный последовательности 95–100 тяжелой цепи H-2D<sup>b</sup>-антигена гистосовместимости мыши [12], а в другом случае — олигосахаридная антигенная детерминанта групповых веществ крови,  $Le^a$  [13]. Кроме того, были приготовлены конъюгаты, содержащие помимо указанных гаптенных еще МДП. Приготовление полиакриламида, несущего гексапептид и/или МДП, осуществляли сополимеризацией мономеров N-акрилоил-ГП и/или N<sup>1</sup>-акрилоил-N<sup>6</sup>-МДП-гексаметилендиамина (МДП-ГДАА) с акриламидом. Таким образом, гексапептид был конъюгирован с полиакриламидом (ПАА) за N-концевую аминокислоту, как и в случае иммобилизации гексапептида на белковых носителях. Полученные сополимеры были очищены от остаточных мономеров на колонке с сефадексом G-100 (рис. 1). В дальнейшем для работы были выбраны фракции ГП-ПАА и ГП-ПАА-МДП, имеющие средние значения молекулярных масс  $(30-40) \cdot 10^3$ . Аминокислотный анализ показал, что в конъюгате ГП-ПАА молярное соотношение ГП и акриламида составляет 1 : 50, а в конъюгате ГП-ПАА-МДП соотношение ГП : МДП : акриламид равно 1 : 2 : 48. Иммобилизацию олигосахарида  $Le^a$  на полиакриламиде проводили как описано ранее [14].

В результате иммунизации мышей линии BALB/c конъюгатами ГП-ПАА, ГП-ПАА-МДП, МДП-ПАА,  $Le^a$ -ПАА,  $Le^a$ -ПАА-МДП и  $Le^a$ -БСА были получены антисыворотки против соответствующих гаптенных. Антисыворотки исследованы твердофазным иммуноферментным анализом. Сыворотка от каждого животного тестировалась отдельно и средние значения (по группам из семи животных) приведены на рис. 2 и 3.

Антисыворотки, полученные против гексапептида, вначале были исследованы на связывание с ГП-КЛН (рис. 2). Показано, что сыворотки, полученные в результате иммунизации ГП-ПАА и ГП-ПАА-МДП, специфически связываются с гексапептидом, иммобилизованным на другом носителе (КЛН). Следовательно, в этих сыворотках содержится значительное количество антител против гексапептида. Особенно высокий титр имеет сыворотка, полученная после иммунизации конъюгатом ГП-ПАА-МДП в дозе 100 мкг. Это означает, что МДП, иммобилизованный на том же носителе, что и гаптен, обладает значительной иммуностимулирующей активностью. Антисыворотка, полученная путем иммунизации ГП-ПАА (доза 100 мкг) в отсутствие МДП и какого-либо другого адъюванта, также существенно сильнее связывается с ГП-КЛН, чем нормальная мышьяная сыворотка. Связывание с гексапептидом сывороток, полученных против конъюгата МДП-ПАА, не превышает связывания нормальной мышьяной сыворотки.

Сходные результаты были получены при тестировании связывания антисывороток с гексапептидом, иммобилизованным на нормальных иммуноглобулинах кролика.

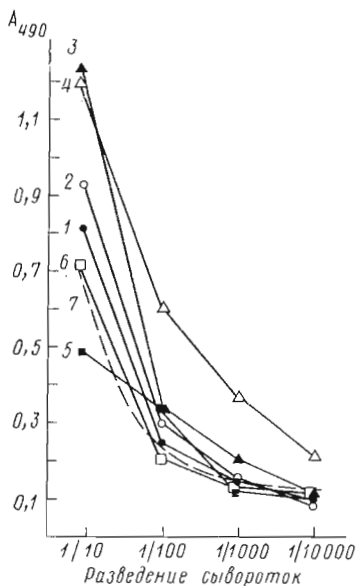


Рис. 2

Рис. 2. Кривые иммуноферментного анализа антисывороток, полученных против: ГП-ПАА в дозе 20 (1) и 100 (2) мкг ГП на иммунизацию; ГП-ПАА-МДП в дозе 20 (3) и 100 (4) мкг ГП на иммунизацию; МДП-ПАА в дозе 20 (5) и 100 (6) мкг МДП на иммунизацию. Исследовалось связывание антисывороток с конъюгатом ГП-КЛН. Кривые связывания антисывороток с КЛН не приведены; они во всех случаях не превышают связывания нормальной мышинной сыворотки с ГП-КЛН (7)

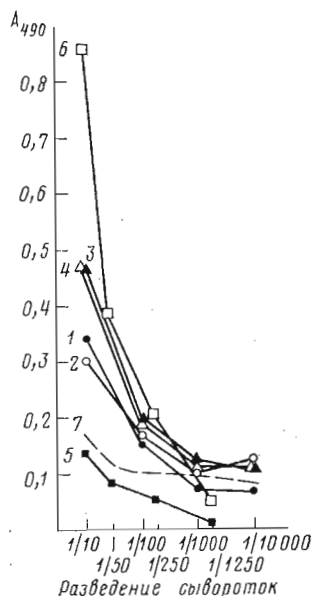


Рис. 3

Рис. 3. Кривые иммуноферментного анализа антисывороток, полученных против: Le<sup>a</sup>-ПАА в дозе 20 (1) и 100 (2) мкг Le<sup>a</sup> на иммунизацию; Le<sup>a</sup>-ПАА-МДП в дозе 20 (3) и 100 (4) мкг Le<sup>a</sup> на иммунизацию; Le<sup>a</sup>-БСА в дозе 20 (5) и 100 (6) мкг Le<sup>a</sup> на иммунизацию. Исследовалось связывание антисывороток с конъюгатом Le<sup>a</sup>-цитохром с. Кривые связывания антисывороток с цитохромом с не приведены; они во всех случаях не превышают связывания нормальной мышинной сыворотки с Le<sup>a</sup>-цитохромом с (7)

Тот факт, что гексапептид, имитирующий антигенную детерминанту молекулы Н-2D<sup>b</sup> [12], способен вызывать иммунный ответ у мышей BALB/c другого гаплотипа (Н-2<sup>d</sup>), позволяет сделать вывод, что соответствующий участок (остатки 95—100) молекулы Н-2D<sup>b</sup> может служить аллотипической антигенной детерминантой.

На рис. 3 приведены кривые связывания антисывороток, полученных против Le<sup>a</sup>-ПАА, Le<sup>a</sup>-ПАА-МДП и Le<sup>a</sup>-БСА, с конъюгатом Le<sup>a</sup>-цитохром с. Все антисыворотки, кроме той, которая была получена против конъюгата Le<sup>a</sup>-БСА в дозе 20 мкг (по гаптену), значительно сильнее взаимодействует с конъюгатом Le<sup>a</sup>-цитохром с, чем нормальная мышинная сыворотка. Следовательно, в указанных антисыворотках содержатся антитела, специфичные к детерминанте Le<sup>a</sup>. Иммунный ответ на Le<sup>a</sup>-ПАА-МДП несколько превышает ответ на Le<sup>a</sup>-ПАА, однако конъюгат Le<sup>a</sup>-ПАА также достаточно иммуногенен. Для подбора оптимального соотношения гаптена и адъюванта, иммобилизованных на одном и том же носителе, необходимы дальнейшие исследования.

Антисыворотка, полученная в результате иммунизации конъюгатом Le<sup>a</sup>-БСА в дозе 100 мкг, обладает высокой активностью. Возможно, что высокая доза БСА, самого по себе являющегося слабым антигеном, способствует гипериммунизации животного против детерминанты Le<sup>a</sup>.

Общий вывод, следующий из данной работы, состоит в установлении принципиальной возможности использования полиакриламидного носителя для создания иммуногенных препаратов на основе гаптенных пептидной и олигосахаридной природы. Показаны также преимущества иммобилизации синтетического иммуноадъюванта МДП на том же носителе,

что и гаптен. Полученные результаты могут способствовать созданию искусственных вакцинирующих молекул, идея конструирования которых была выдвинута М. Села [15, 16].

### Экспериментальная часть

Иммобилизацию гаптенa и МДП на полиакриламиде осуществляли путем сополимеризации производных гаптенa и МДП, содержащих акрилоильную группировку, с акриламидом.

*N*-Акрилоилгексапептид  $CH_2=CHCONH\text{-Leu-Gln-Gln-Leu-Ser-Gly}$  получали в результате конденсации гексапептида Leu-Gln-Gln-Leu-Ser-Gly [12] с *N*-гидроксисукцинимидным эфиром акриловой кислоты, приготовленным по методу [17] следующим образом. Смесь, содержащую 4,4 г *N*-гидроксисукцинимида, 6,4 мл триэтиламина и 29 мл  $H_2O$ , охлаждали до  $0^\circ C$  на ледяной бане. Добавляли по каплям 3,8 мл акрилоилхлорида в течение 10 мин при интенсивном перемешивании. Перемешивание продолжали еще 50 мин, затем выпавший в осадок продукт собирали фильтрованием на стеклянном фильтре. Кристаллизовали из этанола, взяв предварительно пробу на гомогенность (ТСХ на силикагеле 60 F-254 (Merck, ФРГ) в смеси бензол—эфир, 6 : 1). После высушивания над пятиокисью фосфора выход 1,8 г.

10 мг (0,016 ммоль) гексапептида растворяли в 6 мл  $H_2O$  и доводили рН до 8,0 *N*-метилморфолином. Добавляли 2 мл диметилформамида и 5,5 мг *N*-гидроксисукцинимидного эфира акриловой кислоты (0,032 ммоль), растворенного в 0,1 мл диметилформамида. Степень прохождения реакции контролировали ТСХ. После 16 ч перемешивания упаривали реакционную смесь до образования кристаллов. Очистку продукта реакции проводили на колонке (1,0×5,0 см) с целлюлозой MN 300 (Serva, ФРГ), уравновешенной ацетоном. Непрореагировавший *N*-гидроксисукцинимидный эфир элюировали ацетоном. Затем водой элюировали *N*-акрилоил-ГП и лиофилизировали.

*N*<sup>1</sup>-Акрилоил-*N*<sup>6</sup>-(*N*-ацетилмурамоил-*L*-аланил-*D*-изоглутаминил)гексаметилендиамин (МДП-ГДАА) синтезирован как описано в работе [18].

*D*-Galβ1→3(*L*-Fucα1→4)GlcNAcβ1→O( $CH_2$ )<sub>3</sub>NHCOCH=CH<sub>2</sub> (Le<sup>a</sup>-sp-AA) синтезирован как описано в работе [13].

Сополимеризацию МДП-ГДАА и акриламида, приводящую к сополимеру (МДП-ПАА) с соотношением мономеров 1:44, осуществляли по методике [18].

Сополимеризация Le<sup>a</sup>-sp-AA с акриламидом, приводящая к сополимеру (Le<sup>a</sup>-ПАА) с соотношением мономеров 1:17, и сополимеризация Le<sup>a</sup>-sp-AA, МДП-ГДАА и акриламида, приводящая к сополимеру (Le<sup>a</sup>-ПАА-МДП) с соотношением мономеров 1:58:1, описаны в работе [14].

Сополимеризацию *N*-акрилоил-ГП с акриламидом проводили следующим образом. К 10 мг (0,014 ммоль) *N*-акрилоил-ГП добавляли 40 мг (0,563 ммоль) акриламида (Koch-Light, Англия), растворяли в 1,5 мл  $H_2O$ , добавляли 1,5 мг цистеина (Sigma, США) и 5 мг персульфата аммония. Полученный раствор дегазировали и добавляли 0,5 мкл тетраметилэтилендиамина, после чего реакционный сосуд снова вакуумировали и раствор выдерживали 1,5 ч при  $40^\circ C$ . Полимер (ГП-ПАА) осаждали небольшим объемом (~3 мл) этанола. Осадок отделяли декантацией и промывали этанолом.

При получении конъюгата ГП-ПАА-МДП для сополимеризации брали 10 мг (0,014 ммоль) *N*-акрилоил-ГП, 40 мг (0,563 ммоль) акриламида и 9,2 мг (0,014 ммоль) МДП-ГДАА. Сополимеризацию проводили так же, как при получении ГП-ПАА.

Полученные полимеры очищали гель-фильтрацией на сефадексе G-100 и контролировали их состав с помощью аминокислотного анализа.

Иммобилизация гексапептида на белковых носителях. Конъюгат гексапептида с гемоцианином моллюска *Фиссуреллы* получали по методу [19]. Растворяли 2 мг гексапептида и 15 мг КЛН в 2 мл натрий-фосфатного буфера (0,1 М, рН 7,0). Затем прибавляли 1 мл водного раствора глутар-

альдегида (0,021 М) по каплям в течение 1 ч при 20° С. Смесь выдерживали 14 ч и диализовали против натрий-фосфатного буфера. Аналогичным образом получали конъюгат гексапептида с нормальными иммуноглобулинами кролика, очищенными по методу [20].

**Неогликопротеины** [D-Galβ1→3(L-Fucα1→4)GlcNAcβ1→O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CO]<sub>20</sub>-БСА (Le<sup>a</sup>-БСА) и [D-Galβ1→3(L-Fucα1→4)GlcNAcβ1→O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CO]<sub>17</sub>-цитохром с (Le<sup>a</sup>-цитохром с) синтезированы как описано в работе [13].

**Получение антисывороток.** Мыши линии BALB/c, самцы, возрастом 6–8 недель, получены из питомника «Светлые горы» АМН СССР. Иммунизацию проводили в подушечки лап и подкожно следующими препаратами: 1) ГП-ПАА; 2) ГП-ПАА-МДП; 3) МДП-ПАА; 4) Le<sup>a</sup>-ПАА; 5) Le<sup>a</sup>-ПАА-МДП и 6) Le<sup>a</sup>-БСА — в дозах 20 и 100 мкг (по соответствующему гаптену) на полный курс иммунизации. В каждой группе было по 14 животных (по 7 на каждую дозу). При первичной иммунизации вводили по 10 и 50 мкг каждого препарата (в соответствии с дозой), при вторичной и третичной, проводившихся с интервалами в 14 сут., — по 5 и 25 мкг соответственно. Через 10 сут после последней иммунизации у мышей брали кровь. Сыворотки получали путем центрифугирования 15 мин при 1600 g после выдерживания крови при 4° С в течение 2 ч.

**Тестирование антисывороток** проводили твердофазным иммуноферментным методом. Антигенсодержащий материал (ГП-КЛН или ГП-IgG<sub>крол</sub>) при тестировании антисывороток против ГП; Le<sup>a</sup>-цитохром с при тестировании антисывороток против Le<sup>a</sup>) в концентрации 0,1 мг/мл сорбировали на поверхности пластика в панелях для микротитрования (Cooke Microtiter, США) в течение 2 ч при 20° С. Рабочий объем — 50 мкл на 1 лунку. В контрольных лунках сорбировали не содержащие гаптенных белковых носители в той же концентрации. После сорбции промывали панели 3 раза натрий-фосфатным буфером, содержащим 0,05% твин-20. Добавляли в лунки тестируемые сыворотки, разведенные тем же буфером, и инкубировали 30 мин при 37° С. После 3-кратной отмывки тем же буфером добавляли антитела кролика против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена [21]. После 30 мин инкубации при 37° С панели отмывали 3 раза тем же буфером и добавляли субстрат для пероксидазы, приготовленный следующим образом: 6 мг о-фенилендиамина и 5 мкл 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в 10 мл 0,1 М цитратного буфера (рН 5,0). Через 30 мин реакцию останавливали добавлением 1 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> по 50 мкл на 1 лунку. Измеряли поглощение продуктов реакции при 490 нм на приборе MicroELISA Auto Reader MR580 (Dynatech, США).

Авторы выражают глубокую благодарность Ю. А. Овчинникову за постоянное внимание и ценные критические замечания, высказанные при обсуждении данной работы. Авторы благодарят также сотрудника Института морфологии человека АМН СССР И. П. Папазова за помощь при иммунизации животных.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Benjamin D. C., Berzofsky J. A., East I. J., Gurd F. R. N., Hannum C., Leach S. J., Margoliash E., Michael J. G., Miller A., Prager E. M., Reichlin M., Sercarz E. E., Smith-Gill S. J., Todd P. E., Wilson A. C. Ann. Rev. Immunol., 1984, v. 2, p. 67–101.
2. Lemieux R. U., Bundle D. R., Baker D. A. J. Amer. Chem. Soc., 1975, v. 97, № 14, p. 4076–4083.
3. Петров Р. В., Хаитов Р. М., Атауллаханов Р. И. Иммуногенетика и искусственные антигены. М.: Медицина, 1983, с. 36–65.
4. Tada T. In: Fundamental Immunology/Ed. Paul W. E. N.Y.: Raven Press, 1984, p. 481–517.
5. Кифер Х. В кн.: Методы исследований в иммунологии/Ред. Лефковитс И., Пернис Б. М.: Мир, 1981, с. 149–163.
6. Mishell B. B., Shiigi S. M. Selected Methods in Cellular Immunology. San Francisco: Freeman, 1980, p. 343–350.
7. Diamantstein T., Wagner B., L'Agestern J., Beyse I., Odenwald M. V., Schultz G. Eur. J. Immunol., 1971, v. 1, № 2, p. 302–314.
8. Петров Р. В., Гвоздецкий А. Н., Горохов А. А., Евдаков В. П., Кабанов В. А., Кабанова Е. А. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол., 1974, т. 11, № 1, с. 37–45.

9. *Cone R. E.* Pharm. Ther., 1979, v. 8, № 2, p. 321-337.
10. *Ellouz F., Adam A., Ciorbaru R., Lederer E.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1974, v. 59, № 4, p. 1317-1325.
11. *Kotani S., Watanabe Y., Kinoshita F., Shimono T., Morisaki I., Shiba T., Kusumoto S., Tarumi Y., Ikenaka K.* Biken J., 1975, v. 18, № 2, p. 105-111.
12. *Юровский В. В., Сафонова Н. Г., Хайдуков С. В., Василев Р. Г., Демин В. В.* Биоорган. химия, 1986, т. 12, № 1, с. 89-99.
13. *Бовин Н. В., Иванова Н. А., Хорлин А. Я.* Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 5, с. 662-670.
14. *Хорлин А. Я., Бовин Н. В.* Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 5, с. 671-673.
15. *Sela M.* Bull. Inst. Pasteur, 1974, v. 72, p. 72-86.
16. *Sela M.* Proc. of the 3d Int. Congress of Immunol. Sydney, 1977, p. 720-723.
17. *Methods in Enzymol.*/Ed. Colowick S. P. N.Y.: Acad. Press, 1982, v. 83, p. 306-310.
18. *Хорлин А. Я., Абашев Ю. П.* Биоорган. химия, 1984, т. 10, № 8, с. 1119-1126.
19. *Pfaff E., Mussgay M., Böhn H. O., Schulz G. E., Schaller H.* EMBO J, 1982, v. 1, № 7, p. 869-874.
20. *Hudson L., Hay F. C.* Practical Immunology. Oxford: Blackwell Sci. Publ., 1980, p. 169-171.
21. *Avrameas S., Guilbert B. C.* r. Acad. Sci. Paris. Ser. D, 1971, t. 273, p. 2705-2707.

Поступила в редакцию  
28.VI.1985

### ARTIFICIAL PEPTIDE AND CARBOHYDRATE ANTIGENS. IMMOBILIZATION OF HAPTENS AND ADJUVANT (MDP) ON POLYACRYLAMIDE

YUROVSKY V. V., BOVIN N. V., SAFONOVA N. G.,  
VASILOV R. G., KHORLIN A. Ya.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow*

To study the influence of the polyacrylamide carrier on immunogenic properties of the peptide and oligosaccharide haptens, we have prepared artificial antigens by conjugation of a synthetic hexapeptide (homologous to the fragment 95-100 of the murine H-2D<sup>b</sup> antigen heavy chain) or of an oligosaccharide (antigenic determinant of human blood groups, Le<sup>a</sup>) with polyacrylamide. In some cases the conjugates containing also a synthetic glycopeptide adjuvant, N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP), were used. Antisera against haptens were obtained by immunization of BALB/c mice with corresponding conjugates. By the enzyme-linked immunosorbent assay it was shown that these antisera had a high binding titer (up to 10 000) to corresponding hapten, and MDP immobilized on the same carrier as hapten possessed a considerable immunostimulating activity. Thus, usefulness of polyacrylamide for preparation of immunogenic artificial molecules carrying peptide and oligosaccharide haptens was demonstrated.