

МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ АДЬЮВАНТНО АКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ – МИМЕТИКОВ GMDP С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ И КОМБИНАТОРНЫХ БИБЛИОТЕК ПЕПТИДОВ В ФОРМАТЕ ФАГОВОГО ДИСПЛЕЯ

© 2010 г. А. Г. Ламан*, А. О. Шепеляковская*, Х. М. Бозиев*, Г. В. Савинов^{*,**},
Ф. А. Бровко^{*,#}, В. А. Несмеянов^{***}

*Филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, Пущино, Московская обл., проспект Науки, 6;

**Филиал МГУ им. М.В. Ломоносова в г. Пущино, Пущино, Московская обл.;

*** Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Поступила в редакцию 02.06.2009 г. Принята к печати 09.07.2009 г.

Описан метод получения пептидов – миметиков GMDP, потенциально обладающих адьювантной активностью, но без отрицательных эффектов, присущих GMDP. Для поиска пептидов, обладающих адьювантной активностью GMDP были использованы высокоспецифичные моноклональные антитела против GMDP и пептидные комбинаторные библиотеки в формате фагового дисплея. При иммуноаффинном обогащении библиотек для получения высокоаффинных и специфичных пептидов применяли различные методы элюции. При элюции фаговых частиц с иммуносорбента 1 мкМ раствором природного лиганда – GMDP, был получен единственный пептид структуры Arg-Val-Pro-Pro-Arg-Tyr-His-Ala-Lis-Ile-Ser-Pro-Met-Val-Asn (RN). При использовании для элюции буфера с низким значением pH (0.1 М глицин-HCl, pH 2.2) были выделены два пептида: Ser-Gly-Arg-Val-Ala-Val-Ser-Pro-Asp-Ser-Pro-Leu-Phe-Tyr-Pro (SP) и Arg-Tyr-Gly-Gly-Ser-Val-Leu-Asn-Ile-Glu-Cys-Gln-Phe-Tyr-Gly (RG). Константы аффинности для пептидов RN и SP составляли 3.6×10^8 и $3.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ соответственно. Специфичность взаимодействия с моноклональными антителами проверяли с помощью конкурентного вытеснения пептидов из комплекса антиген–антитело с помощью GMDP. Пептид RN обладал адьювантной активностью, сходной с адьювантной активностью GMDP, но не проявлял пирогенного эффекта, присущего GMDP. Метод может быть использован для поиска миметиков биологически активных низкомолекулярных соединений.

Ключевые слова: пептиды-миметики; адьюванты; GMDP–MDP, фаговый дисплей.

ВВЕДЕНИЕ

В Институте биоорганической химии более 30 лет проводятся исследования глюкозаминилмурамоилдипептида (GMDP), фрагмента клеточных стенок бактерий, способного эффективно модулировать иммунный статус, активировать биосинтез антител [1, 2]. GMDP нашел применение в медицине и ветеринарии как иммунокорректор и адьювант. К недостаткам данного соединения в плане его медицинского применения можно отнести его пирогенность. В связи с развитием новых вакцинных технологий, в основе которых лежат использование субъединичных или ДНК-вакцин, обладающих слабой иммуногенностью, значительно возросла роль адьювантов, но при этом возросли и требования к безопасности этих соединений [3]. Считается, что наиболее действенными и эффективными адьювантами могут быть соединения, способные активировать переход клеток иммунной системы из

Сокращения: GMDP – глюкозаминилмурамоилдипептид; MDP – мурамоилдипептид; OPD – орто-фенилендиамин; PBS – 20 мМ фосфат натрия, pH 7.5, 150 мМ NaCl; TBST – 20 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 150 мМ NaCl, 0.1% Твин-20; TE – трансформирующие единицы; ИФА – иммуноферментный анализ.

[#]Автор для связи (тел.: (4967) 73-08-53; эл. почта: brovko@fibkh.serpukhov.su).

состояния естественного ответа в состояние адаптивного, специализированного ответа через активацию патогенассоциированных рецепторов [4]. GMDP относится к таким молекулам.

Рецептор GMDP имеет внутриклеточную локализацию [5]. Поиск рецепторной молекулы для аналога GMDP – мурамоилдипептида (MDP), выявил в качестве внутриклеточного рецептора белок NOD2 [6]. Как было показано Мещеряковой Е. И. и соавт. [7], GMDP и его аналоги, так же как и MDP, способны взаимодействовать с этим внутриклеточным рецептором.

Сильный адьювантный эффект достигается при активации клеток естественного иммунитета природными патогенами – микроорганизмами или вирусами. При этом активируется антителопродукция, а также и клетки иммунной системы. Для современных вакцин необходимы адьюванты, которые, являясь индивидуальными соединениями, были бы способны активировать широкий спектр иммунологических реакций. При активации клеток естественного иммунитета MDP через рецептор NOD2 активируются и другие системы, связанные с патогенассоциированными молекулами, и происходит перекрестная активация антигенпредставляющих клеток [8, 9]. Активация естественных патогенассоциированных рецепторов должна гарантировать как эффективную активацию, так и супрессию иммунных реакций, но при этом нельзя исключить гиперактивацию иммунной системы и, как следствие, развитие аутоиммунных реакций [4]. В настоящее время в получении или конструировании новых адьювантов наметилась тенденция к использованию агонистов патогенассоциированных рецепторов или аналогов природных лигандов этих рецепторов [4].

Наиболее эффективными и безопасными потенциальными адьювантами могут служить пептиды-миметики природных лигандов [10]. При этом для их поиска можно использовать комбинаторные библиотеки как химически синтезированных пептидов [11], так и пептидов, экспонированных на поверхности бактериофага [12]. Ранее Мареевой Т. и соавт. были получены моноклональные антитела к GMDP [13]. Данные антитела были высоко специфичны по отношению к GMDP и узнавали как углеводную, так и пептидную часть молекулы. Эти антитела могли стать эффективным инструментом для поиска пептидов, мимикрирующих GMDP. Данная работа посвящена описанию особенностей поиска пептидов-миметиков GMDP с новыми, более выгодными по отношению к исходному соединению функциональными свойствами с использованием комбинаторных пептидных библиотек в формате фагового дисплея.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для обнаружения искомых пептидов в комбинаторных библиотеках необходимо иметь репортерную молекулу, с которой будут взаимодействовать пептиды. В нашем случае при поиске пептидов-миметиков GMDP использовали антитела к GMDP, полученные и

охарактеризованные ранее [13]. Антитела E6/1.2.B12 принадлежат классу IgG, подклассу $\gamma 1$ и несут легкую цепь каппа-типа. Константа аффинности к GMDP составляет $2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$. Данные антитела обладают высокой специфичностью к лиганду и взаимодействуют как с пептидной, так и с углеводной частью GMDP.

Для решения поставленной задачи в работе использовали две комбинаторные библиотеки, содержащие гекса- или пентадекапептиды в составе вектора FUSE5, любезно представленные Смитом Дж. П. (G.P. Smith, Division of Biological Sciences, Tucker Hall, University of Missouri). Подробное описание библиотек можно найти на сайте лаборатории Смита Дж. П. (<http://www.biosci.missouri.edu/smithgp>).

Нами была использована процедура аффинного выделения фаговых клонов, несущих пептиды, которые могли бы обладать нужными нам свойствами (рис. 1). Использовали два варианта метода истощения, различие между которыми заключалось в том, что в одном элюция фагов во всех раундах истощения проводилась 1 мкМ раствором природного лиганда (GMDP), а в другом – растворами с низкими значениями pH. И в том, и в другом случае раунды истощения проводили с уменьшением концентрации фага (от 10^{13} фаговых частиц/мл в первом раунде до 10^{10} фаговых частиц/мл в четвертом раунде) и антител (от 0.1 до 0.001 мкМ соответственно). Эта процедура была использована с целью получения пептидов с высокой константой аффинности к антителам.

Для библиотеки пентадекапептидов фактор обогащения оказался равным 8×10^4 в расчете на один раунд. В случае же библиотеки гексапептидов количество колоний уменьшалось от раунда к раунду. В связи с этим можно предположить, что последовательности из шести аминокислот в составе белка gp3 фага не могут полностью имитировать пространственную структуру GMDP, либо, что константа связывания гексапептидов с антителами недостаточна для эффективного выделения в используемой методике поиска высокоаффинных лигандов.

После четырех циклов обогащения библиотеки, проведенных с использованием 1 мкМ раствора GMDP для элюции, было отобрано 20 клонов, которые при тестировании методом твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА) показали высокий уровень взаимодействия с антителами E6/1.2.B12 (рис. 2). Поэтому эти клоны были использованы для определения структуры ДНК-вставки. Оказалось, что все клоны содержат на 5'-концевом участке гена gp3 идентичную последовательность: GGG GCT AGG GTT CCT CCG CGT TAT CAT GCT AAG ATT TCT CCT ATG GTG AAG GGG GCC GCT. Эта последовательность кодирует пептид, имеющий следующую структуру: Arg-Val-Pro-Pro-Arg-Tyr-His-Ala-Lis-Ile-Ser-Pro-Met-Val-Asn. Он был назван RN-пептидом. Константу аффинности антител E6/1.2.B12 по отношению к бактериофагу, несущему в составе белка

gp3 RN-пептид, определяли по методу Битти [14]. Величина константы аффинности оказалась равной $3.6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (рис. 2).

После проведения истощения по второму варианту, т. е. растворами с низкими значениями pH, было отобрано 100 клонов. Тестирование методом твердофазного ИФА выявило две группы клонов, различающиеся по величине хромофорного сигнала в анализе. Из каждой группы мы отобрали по 20 представителей, для которых проводили ИФА с убывающей концентрацией бактериофагов. В итоге для одной группы была показана четко выраженная зависимость оптического поглощения в ИФА от концентрации антигена, для второй группы подобной зависимости не наблюдалось, но поглощение значительно превышало фоновый уровень. На основании этих данных были отобраны по 10 клонов из каждой группы для секвенирования ДНК-вставки.

Оказалось, что структуры ДНК внутри каждой из групп клонов одинаковы. Фаги первой группы содержат на 5'-концевом участке гена gp3 последовательность GGG GCT TCT GGT CGG GTT GCT GTT TCT CCT GAT TCG CCT CTT TTT TAT CCG-, которая соответствует аминокислотной последовательности: Ser-Gly-Arg-Val-Ala-Val-Ser-Pro-Asp-Ser-Pro-Leu-Phe-Tyr-Pro. Такой пептид был назван SP-пептидом. Фаги второй группы содержали последовательность -CGG TAT GGG GGT TCT GTT CTT AAT ATT GAG TGT CAG TTT TAT GGT-, которая соответствует аминокислотной последовательности: Arg-Tyr-Gly-Gly-Ser-Val-Leu-Asn-Ile-Glu-Cys-Gln-Phe-Tyr-Gly. Этот пептид был назван RG-пептидом.

На основании этих данных для определения константы аффинности были отобраны пептиды, выделенные из одного из клонов первых двух групп. Константу аффинности определяли по методу Битти [14]. Для SP-пептида константа аффинности оказалась равной $3.5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ (рис. 2). В случае RG-пептида наблюдался высокий уровень неспецифического связывания. Для проверки специфичности связывания полученных пептидов с исходными антителами, как и в случае RN-пептида, определили концентрацию GMDP, при которой комплекс антитело-фаговая частица диссоциирует на 50%.

Кривые вытеснения для пептидов RN и SP практически полностью совпадали, 50%-ная диссоциация наблюдалась при соотношении концентраций GMDP-пептид 1 : 20. Поэтому мы можем утверждать, что выявленные нами пептиды взаимодействуют с антителами E6/1.2.B12 специфично.

При рассмотрении аминокислотных последовательностей RN- и SP-пептидов, в первую очередь, обращала на себя внимание их насыщенность остатками пролина. В обоих случаях на 15 а.о. приходилось три пролиновых звена. Наличие иминокислоты в составе белка ограничивает число степеней свободы для данного участка и создает благоприятные условия для формирования нерегулярных вторичных структур, например, β -изгиба. В случае RN-пептида присутствует последовательность -Pro-Pro-, и третий остаток пролина

локализуется через 7 а.о. На наш взгляд, такой пептид с высокой вероятностью будет формировать складчатую структуру, несмотря на то, что в его состав входит три положительно заряженных аминокислотных остатка $-\text{Arg}^1$, Arg^5 и Lys^9 -, которые, в силу электростатического отталкивания должны «выпрямлять» пептид. В пространстве остатки Arg^1 , Arg^5 и Lys^9 могут максимально удаляться, а Pro^3 - Pro^4 могут образовать жесткую структуру.

Последовательность SP-пептида также насыщена остатками пролина, хотя дипептид - Pro-Pro- не встречается. Обращает на себя внимание сходство последовательностей пептидов. Они имеют в своем составе по два идентичных участка Arg-Val и Ser-Pro. Правда, в первом случае это Arg^1 - Val^2 и Ser^{11} - Pro^{12} , а во втором – Arg^3 - Val^4 и Ser^7 - Pro^8 , а также Ser^{10} - Pro^{11} . В SP-пептиде последовательности Ser-Pro разделены остатком аспарагиновой кислоты, который, обладая отрицательным зарядом, предположительно, может благоприятно влиять на сближение Arg^3 - Val^4 со структурой Ser^7 - Pro^8 - Asp^9 - Ser^{10} - Pro^{11} .

Итак, в результате ряда экспериментов получены пептиды, специфично взаимодействующие с антителами к GMDP, определены аминокислотные последовательности этих пептидов. Доказательством специфичности являются данные об аффинном вытеснении фага (пептида) природным лигандом (рис. 3). Кривые вытеснения для клона RN и SP практически полностью совпали, поэтому в работе не приводятся данные по вытеснению пептида природным лигандом для клона SP. Константы аффинности пептидов RN и SP в составе фагов составили 3.6×10^8 и $3.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ соответственно. Необходимо отметить, что использованные в данной работе моноклональные антитела к GMDP имели константу аффинности по отношению к естественному лиганду $2.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$. Столь близкие иммунохимические характеристики пептидов из выделенных нами клонов свидетельствуют о высокой степени их пространственного подобия. Мы предполагаем, что аминокислотные последовательности Arg-Val- и Ser-Pro- и их пространственное расположение относительно друг друга играют большую роль в имитации природного лиганда.

Для проверки биологической активности был выбран RN-пептид. В первую очередь нас интересовали его адьювантные свойства, пирогенность и иммуногенность. В экспериментах по определению адьювантной активности использовали белковый антиген – овалбумин, которым иммунизировали и мышей линии Balb/c. Была показана колоколообразная зависимость адьювантной активности от дозы в диапазоне от 100 нг до 100 мкг пептида на животное с максимумом в дозе 10мкг (рис. 4). Важным оказалось то, что GMDP в аналогичных дозах обладал более низкой активностью и эквивалентные значения достигались при концентрации GMDP 100 мкг/мышь. Эксперименты по определению пирогенного эффекта и иммуногенности показали, что RN-пептид не пирогенен и не иммуногенен [15].

Заключение

Таким образом, использованный в данной работе подход по поиску биологически активных пептидов-миметиков показал свою эффективность. Были получены три группы пептидов, взаимодействующих с моноклональными антителами к GMDP, причем две группы пептидов взаимодействовали специфично и вытеснялись из комплекса природным лигандом. Для RN-пептида показана адьювантная активность и отсутствие пирогенности. Предложенный подход может быть использован для поиска пептидных миметиков других низкомолекулярных биологически активных соединений.

Экспериментальная часть

Материалы. Комбинаторные пептидные библиотеки в формате фагового дисплея были любезно предоставлены Смитом Дж. П. В библиотеках гекса- или пентадекапептид находился на *N*-конце молекулы белка рIII (gpIII) бактериофага и был представлен во всех пяти копиях белка рIII в составе фага. Библиотека гексапептидов содержала 2×10^8 независимых рекомбинантных клонов, а библиотека пентадекапептидов – 2.5×10^8 независимых рекомбинантных клонов (<http://www.biosci.missouri.edu/smithgp>).

В работе использовали Твин-20, стрептавидин, овальбумин (Sigma, США), конъюгаты антител с пероксидазой хрена, реагенты для иммунохимического анализа (Dako, Дания), 96-луночные иммунопланшеты Mediumsorb (Costar, США), компоненты бактериальных сред (Difco, США), другие реактивы имели квалификацию «х. ч.» или «ос. ч.».

Биотинилирование антител. Антитела против GMDP (клон E6/1.2.B12 [13]), выделенные ионообменной хроматографией на колонке MonoQ (Amersham-Pharmacia Biotech., Великобритания), диализовали против PBS (20 mM Na-фосфатный буфер, pH 7.4, 150 mM NaCl), концентрация антител составляла 1.5 мг/мл, pH раствора антител доводили до 9.0, добавляя по каплям 1 M Na-карбонатный буфер pH 9.0. К 1 мл раствора антител добавляли 1 мкл *N*-оксисукцинимидного эфира биотина в диметилформамиде (10 мг/мл), перемешивали и инкубировали в течение 4 ч при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 10 мкл 1 M NH₄Cl и проводили диализ против PBS.

Сенсибилизация поверхности иммунологических планшетов стрептавидином. В лунку 96-луночного иммунологического планшета вносили по 250 мкл 0.1 M NaHCO₃ (pH 8.6) и по 10 мкл водного раствора стрептавидина (1 мг/мл). Инкубировали в течение ночи при 4°C, после чего удаляли из лунок раствор стрептавидина и вносили по 250 мкл 1% раствора BSA в TBST (20 mM Трис-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% Твин-20) для блокирования участков

неспецифической сорбции. Инкубировали в течение 1 ч при 4°C, удаляли раствор BSA и 6 раз промывали лунки TBST.

Взаимодействие фаговых библиотек с биотинилированными антителами E6/1.2. К 100 мкл препарата фаговой библиотеки добавляли биотинилированные антитела до конечной концентрации 0.1–100 нМ, в зависимости от раунда селекции, и инкубировали в течение ночи при 4°C.

Иммобилизация комплексов биотинилированных антител с фагами на поверхности иммунологического планшета, сенсibiliзирoванного стрептавидином. К комплексу фаговая частица–моноклональное антитело, полученному на предыдущем этапе, добавляли 400 мкл TBST и вносили по 250 мкл препарата комплекса биотинилированных антител с фагами в лунки планшета, предварительно сенсibiliзирoванного стрептавидином. Инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Содержимое лунок удаляли и 10 раз промывали планшет раствором TBST.

Элюция бактериофагов кислым буфером. В лунки 96-луночного иммунопланшета добавляли по 250 мкл буфера элюции (0.1 М глицин-HCl, pH 2.2, содержащего 0.1 мг/мл фенолового красного), инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Элюат переносили в пробирки на 1.5 мл, нейтрализовали добавлением 37 мкл 1 М Трис-HCl, pH 9.1. Величину pH контролировали по изменению окраски индикатора фенолового красного. Полученный препарат использовали для амплификации бактериофагов.

Элюция бактериофагов лигандом. В лунки 96-луночного иммунопланшета добавляли по 250 мкл 1 мкМ раствора GMDP в PBS, инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Содержимое лунок переносили в пробирки на 1.5 мл и использовали для амплификации бактериофагов.

Амплификация бактериофагов элюата. При амплификации бактериофагов элюата, полученного после первого цикла истощения, препарат концентрировали на ультрафильтрах Centricon 30-KDa (Millipore, США) до 50 мкл. В дальнейшем для амплификации элюатов фагов использовали логарифмическую культуру клеток *E. coli* штамма TG1 ($A_{600} = 0.6$), при соотношении клетки/фаговые частицы = 1/20. После совместной инкубации фагов с культурой клеток *E. coli* в течение 30 мин при комнатной температуре ее разбавляли в 100 раз средой LB и инкубировали в течение ночи при 37°C и интенсивной аэрацией. Супернатант полученной культуры использовали для выделения фаговых частиц [16].

Тестирование клонов методом твердофазного иммуоферментного анализа. В лунки 96-луночного иммунопланшета добавляли по 100 мкл раствора антител против GMDP (10 мкг/мл) в 0.1 М NaHCO₃ (pH 8.6), планшет оставляли на ночь при +4°C. Далее раствор антител удаляли, а в лунки наносили 250 мкл 0.1% раствора желатина в TBST. Инкубировали 1.5 ч при комнатной температуре, лунки трижды промывали TBST. Затем в лунки планшета

добавляли по 100 мкл раствора, содержащего 0.1% желатина и бактериофаги в концентрации $5 \cdot 10^{10}$ ТЕ/мл. Планшеты инкубировали в течение ночи при $+4^{\circ}\text{C}$, жидкость удаляли, лунки промывали TBST 5–7 раз. В лунки добавляли раствор кроличьих антител, полученных ранее в нашей лаборатории иммунизацией животных очищенным препаратом фага M13 в разведении 1 : 1000. Планшет инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, отмывали трижды TBST. Далее в лунки добавляли по 100 мкл раствора конъюгата пероксидазы хрена с антикроличьими антителами (Amersham, Англия) в разведении 1 : 500 и инкубировали в течение 30 мин при $+37^{\circ}\text{C}$. Результаты анализа оценивали по активности реакции окисления *орто*-фенилендиамина (OPD), используемого в качестве субстрата для пероксидазы. Измерение хромофорного сигнала проводили при 492 нм с помощью иммуноридера Titertek Multiscan (Flow Laboratories, Англия).

Определение констант аффинности МА против GMDP по отношению к пептидам в составе фагов. В лунки 96-луночного иммунологического планшета добавляли по 100 мкл раствора кроличьих антител против фага M13 в 0.1 М NaHCO_3 (рН 8.6), планшет оставляли на ночь при $+4^{\circ}\text{C}$. Затем раствор антител удаляли, а лунки заполняли 250 мкл 0.1% раствора желатина в TBST. Инкубировали 1.5 ч при комнатной температуре, раствор удаляли, лунки трижды промывали TBST. В лунки планшета добавляли по 100 мкл раствора, содержащего 0.1% желатина и бактериофаги в концентрациях 5×10^{11} фаговых частиц/мл и 2.5×10^{11} фаговых частиц/мл, планшеты инкубировали в течение ночи при $+4^{\circ}\text{C}$. После инкубации жидкость удаляли, а лунки промывали TBST 5–7 раз. Затем в лунки добавляли раствор МА против GMDP от концентрации 3×10^{-8} М в TBST и титровали двукратными разведениями. Планшет инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего снова проводили отмывки TBST. Затем в лунки добавляли по 100 мкл раствора конъюгата пероксидазы хрена с антимышиными антителами в рабочем разведении 1 : 500 и инкубировали в течение 30 мин при $+37^{\circ}\text{C}$. Результаты анализа оценивали по активности реакции окисления OPD, используемого в качестве субстрата для пероксидазы. Измерение хромофорного сигнала проводили при 492 нм с помощью иммуноридера Titertek Multiscan. Строили графики зависимости величины хромофорного сигнала от концентрации МА, по которым определяли значение концентраций МА, при которых величина оптической плотности была равной 50% от максимальной. Константы аффинности вычисляли по формуле: $K_{\text{aff}} = 1/2(2[\text{Ab}''] - [\text{Ab}'])$, где Ab'' – значение концентрации МА при концентрации бактериофагов была $2.5 \cdot 10^{10}$ ТЕ, а Ab' – при концентрации бактериофагов $5 \cdot 10^{10}$ ТЕ/мл.

Вытеснение фага из комплекса фаг–антитело лигандом (GMDP). В лунки 96-луночного иммунологического планшета добавляли по 100 мкл раствора МА против GMDP (1 нМ) в 0.1 М NaHCO_3 (рН 8.6), планшет оставляли на ночь при $+4^{\circ}\text{C}$. Затем раствор антител удаляли, а лунки заполняли 250 мкл 0.1% раствора желатина в TBST для

блокирования сайтов неспецифической сорбции на поверхности планшета. Инкубировали 1.5 ч при комнатной температуре, после чего раствор удаляли, лунки трижды промывали TBST. Затем в лунки планшета добавляли по 100 мкл раствора, содержащего 0.1% желатина и бактериофаги в концентрации $2.4 \cdot 10^{12}$ ТЕ/мл. Планшеты инкубировали в течение ночи при $+4^{\circ}\text{C}$. После инкубации жидкость удаляли, а лунки промывали TBST 5–7 раз. Далее в лунки добавляли раствор GMDP в TBST от 10^{-7} М в двукратных разведениях. Планшеты инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего лунки промывали 5–7 раз TBST. В лунки добавляли раствор кроличьих антител против фага M13 в рабочем разведении 1 : 1000. Планшет инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего снова проводили отмывки TBST. В лунки добавляли по 100 мкл раствора конъюгата пероксидазы хрена с антикроличьими антителами в разведении 1 : 500 и инкубировали в течение 30 мин при 37°C . Результаты анализа оценивали по активности реакции окисления OPD, используемого в качестве субстрата для пероксидазы. Измерение хромофорного сигнала проводили при 492 нм.

Определение адьювантной активности. Работу с животными проводили в соответствии с правилами гуманного обращения с животными. Группы из пяти мышей линии Balb/c иммунизировали внутри-перитонеально овалбумином (Sigma, США), растворенным в 200 мкл PBS в дозе 5 мкг на животное. GMDP или пептид, в дозах от 0.1 до 100 мкг на животное, вводились вместе с овалбумином при первой иммунизации. Через 28 сут проводили вторую иммунизацию овалбумином 2.5 мкг/200 мкл на животное, без адьювантов. Контрольных животных иммунизировали так же, но без адьювантов. Через 3 сут после последней иммунизации производили забор крови из хвостовой вены. Титр антител против овалбумина определяли в твердофазном ИФА [17]. Титр определяли как последнее разведение сыворотки, при котором значение A_{492} в 2 раза превышало аналогичное значение с сывороткой не иммунизированных животных. Индекс адьювантности определяли как соотношение титра сыворотки после иммунизации животных овалбумином в присутствии адьюванта к титру сыворотки после иммунизации животных без адьюванта.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 08-04-00826а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ростовцева Л.И., Андропова Т.М., Малькова В.П., Сорокина И.Б., Иванов В.Т. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. С. 1843–1858.
2. Иванов В.Т., Хаитов Р.М., Андропова Т.М., Пинегин Б.В. // Иммунология. 1996. Т. 2. С. 4–6.
3. Sesardic D., Rijpkema S., Patel B.P. // *Expert. Rev. Vaccines*. 2007. V. 5. P. 849–861.
4. Guy B. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2007. V. 5. P. 505–517.
5. Sumaroka M.V., Litvinov I.S., Khaidukov S.V., Golovina T.N., Kamraz M.V., Komal'eva R.L., Andronova T.M., Makarov E.A., Nesmeyanov V.A., Ivanov V.T. // *FEBS Lett.* 1991. V. 295. P. 48–50.
6. Inohara N., Ogura Y., Fontalba A., Gutierrez O., Pons F., Crespo J., Fukase K., Inamura S., Kusumoto S., Hashimoto M., Foster S.J., Moran A.P., Fernandez-Luna J.L., Nuñez G. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 5509–5512.
7. Meshcheryakova E., Makarov E., Philpott D., Andronova T., Ivanov V. // *Vaccine*. 2007. V. 23. P. 4515–4520.
8. Fritz J.H., Girardin S.E., Fitting C., Werts C., Mengin-Lecreulx D., Caroff M., Cavaillon J.M., Philpott D.J., Adib-Conquy M. // *Eur. J. Immunol.* 2005. V. 35. P. 2459–2470.
9. Takada H., Uehara A. // *Curr. Pharm. Des.* 2006. V. 12. P. 4163–4172.
10. Eichler J. // *Curr. Op. Prot. Chem.* 2008. V. 12. P. 707–713.
11. Carter J.M. // *Epitop Mapping of Protein using the geysen (Pepscan) procedure* 1994. *Peptide Analysis Protocols / Eds Dunn B.M., Pennington M.W.* Totowa: Humana Press, 1994. P. 207–224.
12. Smith G.P., Scott J.K. // *Meth. Enzymol.* 1993. V. 217. P. 228–257.
13. Мареева Т.Ю., Котова О.В., Макаров Е.А., Андропова Т.М., Несмеянов В.А. // Биоорган. химия. 1993. Т. 19. С. 555–561.
14. Beatty J.D., Beatty B.G., Vlahos W.G. // *J. Immun. Meth.* 1987. V. 100. P. 173–179.
15. Laman A.G., Shepelyakovskaya A.O., Berezin I.A., Bozhev K.M., Rodionov I.L., Chulina I.A., Malakhova G.V., Brovko F.A., Murashev A.N., Korpela T.K., Nesmeyanov V.A. // *Vaccine*. 2007. V. 25. P. 2900–2906.
16. Smith G.P. // *Affinity-purifying target clones: biopanning. Cloning in fuse Vectors. Laboratory Manual.* University of Missouri, Columbia, 1992. P. 27–49.
17. Dowillard J.Y., Hoffman T. // *Meth. Enzymol.* 1983. V. 92. P. 168–174.

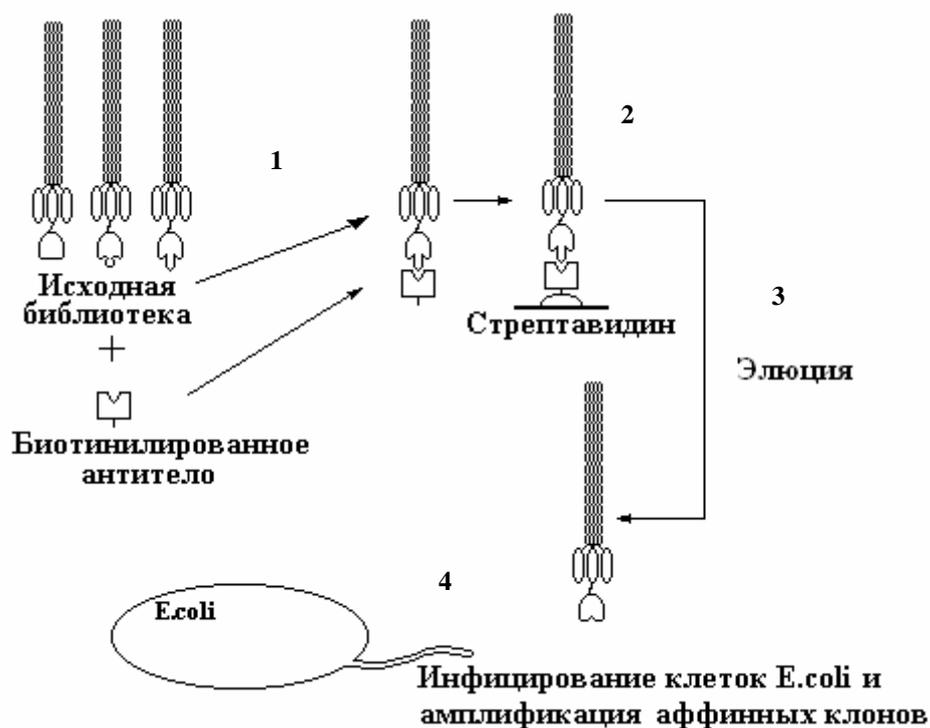


Рис. 1. Схема раунда аффинной селекции пептидной библиотеки в формате фагового дисплея на иммобилизованных антителах. 1 – Взаимодействие биотинилированных антител с фаговой пептидной библиотекой; 2 – взаимодействие комплекса биотинилированные антитела–фаг с иммобилизованным на поверхности иммунопланшета стрептавидином; 3 – отмывка фаговых частиц, не вступивших во взаимодействие, и элюция специфически связавшихся с антителами фаговых частиц; 4 – амплификация элюированных фаговых частиц.

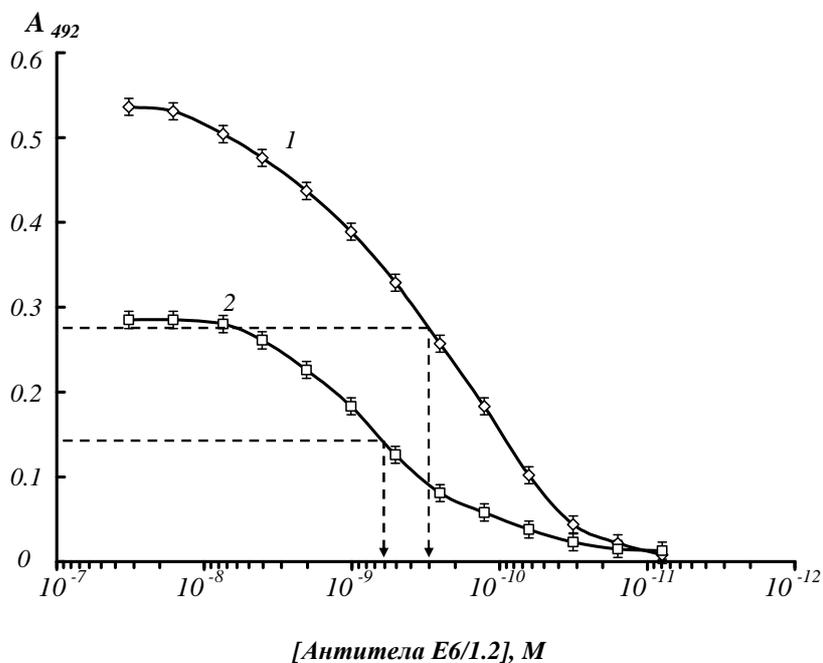


Рис. 2. Определение константы аффинности фаговых частиц, экспонирующих на поверхности RN-пептид, к моноклональным антителам против GMDP (E6/1.2). Приведены кривые титрования моноклональных антител E6/1.2 на иммобилизованных фаговых частицах при концентрации фаговых частиц (ф.ч.) 5×10^{10} (1) и 2.5×10^{10} ф.ч./мл (2).

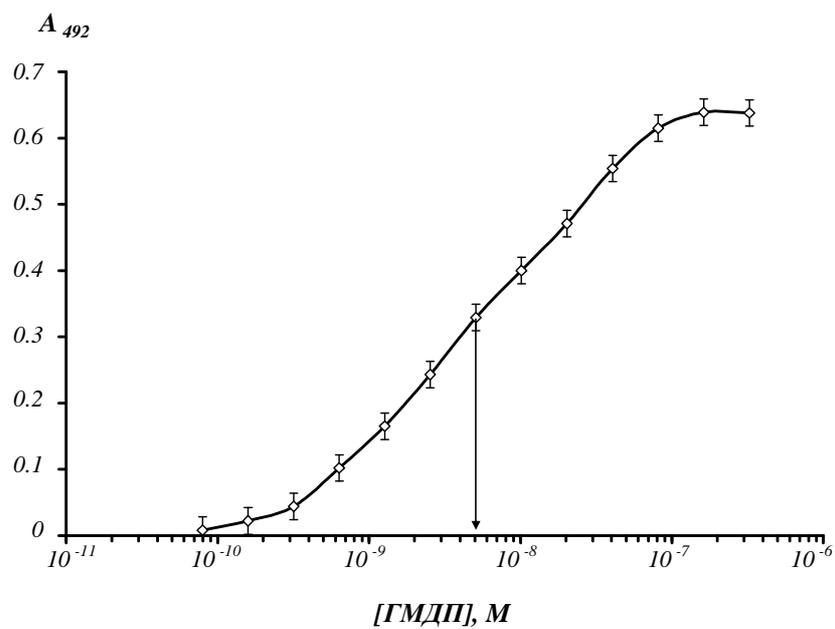


Рис. 3. Вытеснение природным лигандом (GMDP) фаговых частиц, экспонирующих RN-пептид, из комплекса пептид–антитело Е6/1.2.

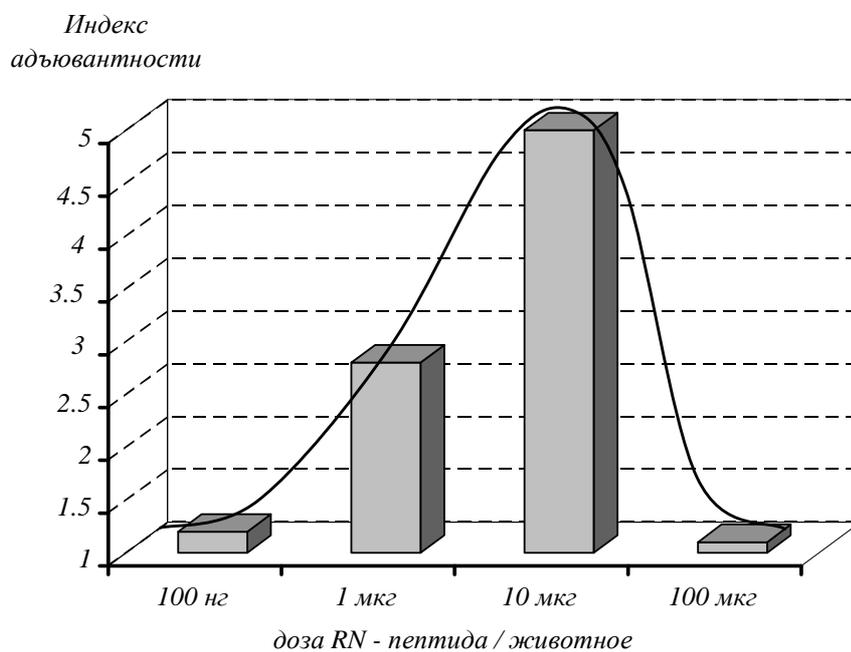


Рис. 4. График зависимости индекса адьювантности от дозы RN-пептида.