



УДК 112.6.017

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ С ПОМОЩЬЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ ФРАГМЕНТОВ СУРВИВИНА

© 2008 г. Т. Д. Волкова**, Д. О. Короев*, М. А. Титова*, М. Б. Обозная*, М. П. Филатова*,
А. А. Панкратов**, Н. Б. Морозова**, Ю. Б. Золотавкина**,
Р. И. Якубовская**, О. М. Вольпина*

*Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

**Научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена, Москва

Поступила в редакцию 21.05.2007 г. Принята к печати 26.09.2007 г.

Эндогенный белок сурвивин присутствует в опухолевых клетках и является ингибитором апоптоза. С целью изучения возможностей разработки противоопухолевого вакцинирующего препарата на его основе исследовано влияние вакцинации мышей его фрагментами на рост различных типов опухолей. На основании данных литературы и теоретических расчетов были выбраны и синтезированы два пептида, соответствующих последовательности (118–144) и (80–88)–(153–165) сурвивина 2В, и изучена их способность стимулировать образование антител у мышей линии С57BL/6J (b-гаплотип) и у гибридов BDF1 (b × d-гаплотип). Показано, что оба пептида стимулируют у мышей BDF1 образование антител, связывающихся с рекомбинантным сурвивином. Иммунизация рекомбинантным сурвивином мышей BDF1 и С57BL/6J вызывает образование антител, связывающихся с пептидом (118–144). Изучено влияние превентивной вакцинации пептидами и рекомбинантным белком на динамику роста нескольких видов опухолей. Показано, что вакцинация пептидом (80–88)–(153–165) вызывает противоопухолевый эффект у мышей BDF1 с саркомой S-37. Таким образом, разработка препарата на основе этого пептида для терапии опухолей представляется перспективным направлением дальнейших исследований.

Ключевые слова: противоопухолевая иммунотерапия, сурвивин, синтетические пептиды, Т-эпитопы, антитела.

ВВЕДЕНИЕ

Сурвивин – эндогенный белок, относящийся к семейству белков-ингибиторов апоптоза. В норме он участвует в процессах митоза и эмбрионального развития, поэтому присутствует преимущественно в эмбриональных клетках и в нормальных соматических клетках в течение краткого периода митоза. В опухолях многих типов сурвивин экспрессируется в больших количествах и подавляет апоптоз [1]. Существует несколько изоформ белка, среди них сурвивин 2В, содержащий 165 а.о., и его укороченный вариант, сурвивин, который содержит 142 а.о., в нем отсутствует участок 75–97 [2, 3].

Поскольку экспрессия сурвивина опухолевыми клетками препятствует апоптозу, стимулируемому химиотерапевтическими агентами, а неблагоприят-

ный прогноз болезни коррелирует с повышенной выработкой этого белка, создание иммунотерапевтических противоопухолевых препаратов на основе сурвивина вызывает большой интерес исследователей [4–8]. В настоящее время разрабатываются пептидные противоопухолевые вакцины на основе “коротких” 9–10-членных пептидных фрагментов сурвивина, которые представляют собой эпитопы для CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов [9, 10]. Недостатком “коротких” пептидов является их невысокое терапевтическое действие и ограничение противопептидного иммунного ответа, обусловленное различиями в антигенах главного комплекса гистосовместимости (МНС-рестрикция) отдельных индивидуумов. Последнее означает, что эти препараты можно будет применять для иммунотерапии только тех людей, которые имеют соответствующий генотип [11, 12]. Кроме того, применение такого подхода делает невозможным изучение на экспериментальных животных действия пептидных вакцин, включающих эпитопы, связывающиеся с рецепторами цитотоксических Т-клеток человека.

Ранее было показано, что цитотоксические Т-эпитопы могут быть эффективно представлены в

Сокращения: НАФ – неполный адъювант Фрейнда; ПАФ – полный адъювант Фрейнда; DIEA – N-этилдиизопропиламин; МНС – главный комплекс гистосовместимости; DIPС – N,N-диизопропилкарбодиимид; DMAР – 4-диметиламинопиридин; Fmoc – 9-флуоренилметоксикарбонил; Pbf – 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил; RecSur – рекомбинантный сурвивин; ТВТУ – тетрафторборат O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N,N'-тетраметилмочевины; TIS – триизопропилсилан.

* Автор для связи (тел.: (495) 336-57-77; эл. почта: tdvol@ibch.ru).

составе “длинных” (20–30 а.о.) пептидов совместно с Т-хелперными эпитопами, а также была экспериментально подтверждена возможность терапевтической вакцинации “длинными” пептидами против саркомы и папилломы [13, 14]. Мы предположили, что иммунотерапевтической противоопухолевой активностью должны обладать “длинные” фрагменты сурвивина, содержащие в своей последовательности одновременно набор цитотоксических и хелперных эпитопов для CD8⁺- и CD4⁺-Т-лимфоцитов как человека, так и мыши, способных связываться с большим набором молекул МНС. Вакцинация такими пептидами должна вызывать цитотоксический противоопухолевый ответ и сопровождаться активацией Т1-хелперов, которые необходимы для адекватного развития цитотоксических клеток. Включение в состав пептида эпитопов для связывания с рецепторами Т-клеток мыши позволит прово-

дить испытания противоопухолевых препаратов на хорошо изученных животных моделях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Целью настоящего исследования является изучение возможностей разработки противоопухолевого вакцинирующего препарата на основе “длинных” синтетических фрагментов сурвивина. Для этого был проведен теоретический расчет Т-хелперных и цитотоксических эпитопов в последовательности сурвивина 2В человека [3]. Для теоретического расчета были использованы описанные в литературе методы [15] и разработанные нами ранее подходы [16–18]. Для синтеза и последующих исследований были выбраны два фрагмента сурвивина 2В:

(118-144)	118 ELTLGEFLKLDRE RAKNKIAKETNNKK	144	(I)
(80-88)–(153-165)	80 88 153 165 AYACNTSTL–K VRRRAIEQLAAMD		(II)

Пептид (I) содержит большой набор теоретически рассчитанных эпитопов, распознаваемых рецепторами хелперных и цитотоксических Т-лимфоцитов мыши и человека. Кроме того, он включает описанные в литературе экспериментально подтвержденные эпитопы для связывания с рецепторами цитотоксических Т-клеток человека [12]. Пептид (II) включает 9-членный цитотоксический эпитоп (124–133), предложенный в качестве иммунотерапевтического противоопухолевого препарата [10]. Пептид (II) является конструкцией, состоящей из двух участков – (80–88) и (153–165), которые содержат экспериментально подтвержденные и теоретически рассчитанные цитотоксические эпитопы для связывания с CD8⁺-Т-клетками человека и мыши. На основе фрагмента 80–88 в настоящее время разрабатывается иммунотерапевтический противоопухолевый препарат, который проходит клинические испытания [9]. Кроме того, согласно теоретическим расчетам, в пептидной конструкции (80–88)–(153–165) формируется новый Т-хелперный эпитоп последовательности YACNTSTLK.

Пептиды (I) и (II) были синтезированы твердофазным методом по Fmoc-схеме и после деблокирования очищены с помощью препаративной ВЭЖХ и охарактеризованы данными аминокислотного анализа, аналитической ВЭЖХ и масс-спектрометрии.

На первом этапе исследований была изучена способность синтетических пептидов (I), (II), их смеси и рекомбинантного сурвивина (RecSur) стимулировать образование антител у мышей, ис-

пользуемых в противоопухолевых исследованиях, – C57BL/6J (b-гаплотип) и гибридных мышах BDF1 (b × d-гаплотип). Всеми препаратами иммунизировали по пять мышей каждой линии. Животных иммунизировали двукратно с интервалом в 30 дней. В качестве адъюванта использовали ПАФ для первой иммунизации и НАФ для второй иммунизации. Описано, что такая схема иммунизации вызывает активацию преимущественно Т1-хелперных клеток [19], которая необходима для развития специфического цитотоксического противоопухолевого Т-клеточного ответа [20]. Через 7 сут после 2-й иммунизации у части животных из каждой группы отбирали кровь и определяли уровень антител, индуцируемых изучаемыми препаратами у каждого животного индивидуально. В табл. 1 приведены титры антител только тех животных, в сыворотках которых были выявлены антитела.

Результаты исследований показали, что мыши C57BL/6J (b-гаплотип) не способны стимулировать образование антител в ответ на иммунизацию пептидами (I), (II) или их смесью. Иммуногенная активность пептидов на гибридных мышах BDF1 (b × d-гаплотип) значительно различается от животного к животному. Иммунизация пептидом (I) или пептидом (II) приводит к образованию антител у трех животных из пяти иммунизированных, а при иммунизации смесью пептидов антитела образуются только у двух животных из группы. При введении рекомбинантного белка мышам BDF1 и C57BL/6J наблюдается картина, сходная с иммунным ответом на пептиды у мышей BDF1 – только у части иммунизи-

Таблица 1. Способность пептидов и рекомбинантного сурвивина стимулировать образование антител у мышей разных линий*

Иммуноген	Антиген на плате	Номер сыворотки/титр антител (-lg)						
		BDF1				C57BL/6J		
(I)	(I)	1	2	3	—	—	—	
		4.4	4.4	3.3	—	—	—	
		RecSur	3.5	4.1	3.2	—	—	—
(II)	(II)	4	5	6	—	—	—	
		3.5	4.1	3.8	—	—	—	
		RecSur	4.4	4.7	4.1	—	—	—
(I)+(II)	(I)	6	7	—	—	8	—	
		4.4	4.4	—	—	<1.0	—	
	(II)	3.1	<1.0	—	—	2.2	—	
		RecSur	4.4	4.4	—	—	<1.0	—
	RecSur	RecSur	9	10	11	12	13	14
			3.4	5.5	4.1	3.8	3.8	3.4
(I)			<1.0	3.1	2.8	2.2	2.8	2.2
(II)			<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0

* Приведены результаты только для сывороток, титр противопептидных антител для которых был больше 1.

ванных животных определяются антитела (у четырех из пяти мышей BDF1 и у двух из пяти мышей C57BL/6J). Таким образом, поскольку мыши, несущие b-гаплотип, не отвечают на пептиды, а в группе гибридных мышей b × d-гаплотипа часть животных ответила на введение пептидов, показано, что иммунный ответ на изучаемые синтетические пептиды имеет ограничения по МНС. С другой стороны, гетерогенность иммунного ответа у линейных животных на введение белка не может быть связана с избирательностью иммунного ответа, вызванной различиями в антигенах МНС у разных линий, а обусловлена иными факторами, ограничивающими иммунный ответ на эндогенный опухолеассоциированный белок.

Для определения специфичности антител, стимулируемых пептидами и рекомбинантным белком, была изучена способность противопептидных сывороток связываться с белком и противобелковых сывороток связываться с пептидными фрагментами (табл. 1). При анализе полученных данных следует иметь в виду, что в рекомбинантном сурвивине отсутствует участок 80–88 пептида (II).

Как показали результаты исследований, пептиды (I), (II), а также их смесь стимулируют образование антител, интенсивно связывающихся с рекомбинантным белком. В то же время противобелковые антитела слабо связываются с пептидом (I). Ни одна из противобелковых сывороток не была способна связываться с пептидом (II). Таким образом, RecSur не способен стимулировать образование антител на C-концевой фрагмент 153–165, присут-

ствующий в пептиде (II). И если антитела, направленные против пептида (I), индуцируются при иммунизации как самим пептидом (I), так и белком RecSur, то индукция антител к пептиду (II) происходит только в результате иммунизации самим пептидом. Обращает на себя внимание то, что сыворотки, полученные к пептиду (II), связываются с RecSur с большими титрами, чем с самим пептидом. Возможно, это происходит за счет того, что участок 153–165, общий для пептида и для белка, лучше представлен антителам в белке, сорбированном на пластике, чем в пептиде.

В связи с тем, что одним из важных показателей развития T1-хелперного ответа является высокое соотношение IgG2a/IgG1 [21], в сыворотках животных, ответивших на препараты, был определен уровень IgG2a и IgG1 антител (табл. 2). Превышение уровня IgG2a над уровнем IgG1 наблюдалось в двух сыворотках, связывающихся с пептидом (II), а также в трех сыворотках, полученных к рекомбинантному белку. В целом, антитела, направленные к пептиду (II) и к RecSur, имеют более высокие значения соотношения IgG2a/IgG1, чем антитела, направленные к пептиду (I).

На следующем этапе работы было изучено влияние превентивной вакцинации пептидами (I), (II), их смесью и белком RecSur на динамику роста следующих опухолей: карцинома легкого Льюис, меланома В-16, солидная форма лимфолейкоза Р-388 и саркома S-37. Исследования карциномы легких и меланомы были выполнены на мышцах линии C57BL/6J, а исследования саркомы и лейкоза – на гибридных

Таблица 2. Определение изотипов антител в сыворотках индивидуальных животных

Антиген	Номер сыворотки	Оптическое поглощение при разведении 1/200 (A_{492})		Соотношение IgG2a/IgG1
		IgG2a	IgG1	
(I)	1	0.454	0.719	0.6
	2	0.995	1.272	0.8
	3	0.126	0.419	0.3
	6	0.554	1.142	0.3
	7	0.466	0.904	0.5
(II)	4	0.762	0.468	1.6
	5	0.240	0.371	0.7
	6	0.597	1.055	0.6
	7	0.184	0.311	0.6
RecSur	8	0.143	0.096	1.5
	9	0.506	0.834	0.6
	10	1.154	1.074	1.1
	11	0.908	0.865	1.0
	12	0.645	0.936	0.7
	13	0.801	0.759	1.1
	14	0.503	0.551	0.9

Таблица 3. Объем опухолей (мм^3) в группе мышей, иммунизированных пептидом (II), и в контрольной группе

Время после иммунизации, сут				
Пептид (II)				
0	5	10	17	24
3	15	120	720	1275
3	6	140	400	1428
4	16	96	440	1260
4	6	140	400	1248
4	16	112	594	1530
Контроль*				
3	36	245	660	1680
3	20	336	792	2016
3	16	200	792	2205
3	16	175	780	1440
3	14	160	432	2432
$p = 0.050$	$p = 0.105$	$p = 0.009$	$p = 0.074$	$p = 0.016$

* В качестве контроля использовали животных, которым вводили 0.9% раствор NaCl в адьюванте по описанной схеме.

мышцах BDF1. Животных иммунизировали препаратами по вышеописанной схеме, и на 7-е сут после второй иммунизации животным перевивали опухоли. Размеры опухоли измеряли в течение 24 сут.

Результаты исследований показали, что у мышей с саркомой S-37 при вакцинации пептидом (II) наблюдалось ингибирование роста опухоли. В табл. 3 приведены размеры опухоли индивидуально для каждого животного в опытной и в контрольной группе в различные сроки после перевивания опухоли, а на рисунке изображены графически средние результаты для каждой группы в различные сроки, вычисленные как среднее арифметическое. Достоверные различия между контрольной и опытной группой ($p < 0.05$), рассчитанные по методу Манна-Уитни, наблюдались на 10-е и 24-е сутки после перевивания опухоли. Иммунизация смесью пептидов (I) и (II), пептидом (I) или RecSur не вызывала достоверных изменений темпа роста саркомы S-37. В случае карциномы легкого Льюис, меланомы B-16 и солидной формы лимфолейкоза P-388 превентивная вакцинация изученными препаратами также не приводила к достоверному замедлению роста.

Таким образом, проведенные исследования показывают, что превентивная вакцинация пептидом (II) вызывает противоопухолевый эффект у мышей с саркомой S-37, ингибируя ее рост. Сопоставление данных об эффективности противоопухолевого иммунотерапевтического действия пептида (II) и его способности стимулировать образование антител показывает, что только этот пептид способен у части мышей BDF1 (b × d-гаплотип) стимулировать образование антител против C-концевого участка белка с высоким соотношением IgG2a/IgG1, что свидетельствует о возможности активации этим пептидом опухолеспецифических цитотоксических Т-клеток. Возможно, невысокая противоопухолевая активность пептида (II) связана с тем, что только часть используемых в опыте мышей BDF1 отвечает на этот препарат (см. табл. 2). Необходимо подчеркнуть, что пептид (II) стимулирует образование уникальных антител, которые не способен стимулировать RecSur. Индукция этих антител обусловлена не природной структурой пептида (II), состоящего из двух фрагментов сурвивина 2B: (80–88) и (153–165).

Таким образом, разработка препарата на основе пептида (II) для терапии опухолей представляется перспективным направлением дальнейших исследований по противоопухолевой иммунотерапии с помощью синтетических фрагментов сурвивина. В дальнейшем планируется проведение исследований по увеличению противоопухолевой активности препарата как с помощью модификации структуры пептида, так и использования новой, более эффективной адьювантной системы для стимулирования развития цитотоксического ответа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы для пептидного синтеза и производные аминокислот (Merck, ФРГ; Fluka, Швейцария), *n*-алкоксибензильный полимер (Merck, ФРГ). Рекombинантный сурвивин, содержащий 142 а.о. [2], полученный экспрессией в *E. coli*, был любезно предоставлен сотрудниками лаборатории структуры и функции генов человека ИБХ РАН.

Для проведения ВЭЖХ использовали хроматограф System Gold (Beckman, США), колонки Jupiter 5μ C18 300A 250 × 4.6 мм (Phenomenex, США) – для аналитической и Jupiter 10μ C18 300A 250 × 10 мм (Phenomenex, США) – для препаративной хроматографии. Масс-спектрометрию осуществляли методом MALDI на приборе VISION 2000 (Bioanalysis, Великобритания). Аминокислотный анализ проводили на приборе Biotronik LC-3000 (ФРГ) после гидролиза пептидов смесью 6 н. HCl–TFA (2 : 1) в течение 45 мин при 170°C. Все синтезированные пептиды имели корректный аминокислотный состав.

В биологических исследованиях применяли ПАФ, НАФ, козьи антитела против суммарных иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США), козьи антитела к IgG1, IgG2a мыши (Sigma, США), а также антитела кролика к иммуноглобулинам козы, конъюгированные с пероксидазой хрена (ИМТЕК, Россия); 96-луночные планшеты для ИФА Maxisorp (Nunc, Дания). Для иммунизации использовали самок мышей из питомника “Столбовая” C57BL/6J и BDF1, возраст 6–7 недель.

Твердофазный синтез и очистку пептидов проводили как описано в работе [17]. Присоединение очередных Fmoc-защищенных аминокислотных остатков проводили однократно за исключением случаев, когда на растущем пептидил-полимере после реакции конденсации обнаруживали непрореагировавшие аминогруппы. В ходе синтеза пептида (I) повторную реакцию конденсации проводили для следующих Fmoc-защищенных остатков: Asn¹⁴², Asn¹⁴¹, Ile¹³⁶, Lys(Boc)¹³⁵ и Lys(Boc)¹³³, Arg(Pbf)¹³¹, Glu(OBu^t)¹²³, Thr(Bu^t)¹²⁰, присоединение остатка Asn¹³⁴ проводили 4 раза. Во время синтеза пептида (II) повторную реакцию конденсации проводили для остатков Glu(OBu^t)¹⁵⁹, Arg(Pbf)¹⁵⁶, Arg(Pbf)¹⁵⁵, Val¹⁵⁴ и Thr(Bu^t)⁸⁵.

По окончании синтеза Fmoc-группу удаляли, пептидил-полимер промывали этанолом и высушивали. Отщепление пептида (I) от полимера с одновременным деблокированием проводили, используя аликвоту пептидил-полимера (300 мг в 4 мл смеси TFA (95%), H₂O (2.5%), TIS (2.5%)) в течение 2 ч. Пептид (II) во избежание окисления остатка Cys⁸³ отщепляли в присутствии восстанавливающего реагента 1,2-этандитиола в 4 мл смеси TFA (94.5%), H₂O (2.5%), 2-этандитиола (2.5%), TIS (1%) в течение 2 ч. После отщепления раствор отфильтровывали

Объем опухоли, мм³



Динамика роста саркомы S-37 после иммунизации пептидом (II) мышей BDF1.

вали от полимера, упаривали при пониженном давлении, затем добавляли 100 мл диэтилового эфира, полученный осадок отфильтровывали и промывали эфиром (5 × 20 мл).

Очистку пептидов проводили с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиенте ацетонитрила в 0.1% TFA (от 10 до 70%) за 60 мин при расходе элюента 3 мл/мин, поглощение элюата регистрировали при длине волны 226 нм. Выход пептидов составил 57% для (I), 6.8% для (II) в расчете на содержание гидроксильных групп на полимерном носителе.

Аналитическую ВЭЖХ проводили в условиях, аналогичных препаративной, при скорости потока элюента 1 мл/мин. Времена выхода пептидов (I) и (II) составили 14.5 и 31.3 мин соответственно. По данным аминокислотного анализа и МС, пептиды имели корректный аминокислотный состав и молекулярные массы: m/z 3187 для $[M + H]^+$ пептида (I) (3187.7 – вычисленная) и m/z 2426 для $[M + H]^+$ пептида (II) (2424.8 – вычисленная).

Иммунизация животных. Для иммунизации использовали пептиды (I), (II), смесь пептидов (I) и (II), а также RecSur. Готовили растворы свободного пептида (I) либо RecSur в 0.9% раствора NaCl в концентрации 2 мг/мл. В случае пептида (II), а также смеси пептидов (I) и (II), готовили раствор препаратов в DMSO, а затем добавляли 0.9% раствор NaCl до концентрации DMSO 30% и концентрации препарата 2 мг/мл. Полученные растворы смешивали с равным объемом ПАФ для первой или НАФ для второй иммунизаций до получения эмульсии. Эмульсию вводили подкожно в основание хвоста в объеме 0.1 мл из расчета 50 мкг пептида или белка на одно животное. Иммунизацию проводили двукратно с интервалом в 30 сут. В качестве контроля для изучения содержания антител в сыворотках использовали интактных животных, а для изучения противоопухолевой эффективно-

сти – животных, иммунизированных 0.9% раствора NaCl в адьюванте по описанной схеме.

Изучение противоопухолевой эффективности было проведено на мышах BDF1 и C57BL/6J с перевиваемыми опухолями различного гистогенеза – карциноме легкого Льюис (LLC), саркоме S-37, меланоме B-16 и лимфолейкозе P-388. В каждой исследуемой группе использовали пять мышей.

Опухолевые штаммы были получены из банка опухолевых штаммов РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН и поддерживались в условиях *in vivo* в отделении модификаторов и протекторов противоопухолевой терапии МНИОИ им. П.А. Герцена.

Опухолевые штаммы карциномы LLC и меланомы B-16 поддерживали в солидном варианте на мышах линии C57Bl/6j, самцах. Для исследований карциному LLC или меланому B-16 прививали мышам-реципиентам под кожу на бок соответственно по 20 мг или 30 мг опухолевой ткани на мышь в 0.2 мл 0.9% раствора NaCl.

Опухолевые штаммы лимфолейкоза P-388 и саркомы S-37 поддерживали в асцитном варианте на мышах линий DBA и SHK, самцах, соответственно. Для исследований лимфолейкоз P-388 или саркому S-37 прививали мышам-реципиентам (BDF₁) под кожу на бок по 0.1 мл асцитической жидкости, предварительно разведенной 1 : 20 или 1 : 3 соответственно 0.9% раствором NaCl.

Опухоли перевивали через 7 сут после второй иммунизации.

Терапевтическую эффективность оценивали по динамике роста опухолевого узла в опытных и контрольных группах. Объем опухолевого узла определяли по формуле: $V_{\text{оп}} = d_1 \times d_2 \times d_3$ (три взаимно перпендикулярных диаметра опухолевого узла). Достоверные различия между контрольной и опытной группой рассчитывали по методу Манна-Уитни с помощью статистической программы SPSS для Windows (версия 13).

Получение сывороток и определение титра противопептидных антител. У пяти мышей из каждой группы отбирали кровь тотально через 7 сут после второго введения препаратов. Титры противопептидных антител определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа как описано в работе [22]. Пептиды наносили на планшет в объеме 0.1 мл на лунку при концентрации пептида 20 мкг/мл. RecSur наносили на планшет в объеме 0.1 мл на лунку при концентрации белка 10 мкг/мл. В качестве контроля использовали сыворотки контрольных животных. За титр антител принимали отрицательный логарифм ($-lg$) значения наибольшего разведения сыворотки, дающего окрашивание более 0.1 ОЕ₄₉₂ и превышающего фоновый уровень в два раза.

Для определения содержания IgG1 и IgG2a в сыворотках к пептидам, сорбированным на планшетах, добавляли по 100 мкл противопептидных сыво-

роток в разведении 1 : 200, после инкубации и отмывки и вносили в лунки по 100 мкл козьих антител к IgG1 и IgG2a мыши в разведении 1 : 1000 с последующей инкубацией при 37°C в течение 1 ч. После отмывок вносили в лунки по 100 мкл кроличьих антител к иммуноглобулинам козы, конъюгированных с пероксидазой хрена, в разведении 1 : 5000. После проведения стандартных операций [22] измеряли оптическое поглощение (при $\lambda = 492$ нм).

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы Миннауки “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники” 2002–2006 гг. ЛОТ 6. ЖС-КП.3/002. “Создание технологии дифференциальной протеомики и ее использование для получения новых противораковых препаратов”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Altieri D.C., Marchisio C. // Lab. Investig. 1999. V. 79. P. 1327–1333.
2. Ambrosini G., Adida C., Altieri D.C. // Nat. Med. 1997. V. 3. P. 917–921.
3. Mahotka C., Wenzel M., Springer E., Gabbert H.E., Gerharz C.D. // Cancer Res. 1999. V. 59. P. 6097–6102.
4. Adida C., Haioun C., Gaulard P., Lepage E., Morel P., Briere J., Dombret H., Reyes F., Diebold J., Gisselbrecht C., Salles G., Altieri D.C., Molina T.J. // Blood. 2000. V. 96. P. 1921–1925.
5. Kawasaki H., Altieri D.C., Lu C.D., Toyoda M., Tenjo T., Tanigawa N. // Cancer Res. 1998. V. 58. P. 5071–5074.
6. Lu C.D., Altieri D.C., Tanigawa N. // Cancer Res. 1998. V. 58. P. 1808–1812.
7. Tanaka K., Iwamoto S., Gon G., Nohara T., Iwamoto M., Tanigawa N. // Clin. Cancer Res. 2000. V. 6. P. 127–134.
8. Satoh K., Kaneko K., Hirota M., Masamune A., Satoh A., Shimosegawa T. // Cancer. 2001. V. 92. P. 271–278.
9. Tsuruma T., Hata F., Torigoe T., Furuhashi T., Idenoue S., Kurotaki T., Yamamoto M., Yagihashi A., et al. // J. Transl. Med. 2004. V. 2. P. 19.
10. Wobser M., Keikavoussi P., Kunzmann V., Weininger M., Andersen M.H., Becker J.C. // Cancer Immunol. Immunother. 2006. V. 55. P. 1294–1298.
11. Reker S., Meier A., Holten-Andersen L., Svane I.M., Becker J.C., thor Straten P., Andersen M.H. // Cancer Biol. Ther. 2004. V. 3. P. 173–179.
12. Friedrichs B., Siegel S., Andersen M.H., Schmitz N., Zeis M. // Leuk. Lymphoma. 2006. V. 47. P. 978–985.
13. Vambutas A., DeVoti J., Nouri M., Drijfhout J.W., Lipford G.B., Bonagura V.R., van der Burg S.H., Melief C.J. // Vaccine. 2005. V. 23. P. 5271–5280.
14. Zwaveling S., Ferreira Mota S.C., Nouta J., Johnson M., Lipford G.B., Offringa R., van der Burg S.H., Melief C.J. // J. Immunol. 2002. V. 169. P. 350–358.
15. <http://www.syfpeithi.de>
16. Vol'pina O.M., Titova M.A., Zhmak M.N., Korojev D.O., Oboznaya M.B., Volkova T.D., Ivanov V.T. // Russ. J. of

Bioorganic Chemistry. 2002. V. 28. P. 349–356 (Вольпина О.М., Титова М.А., Жмак М.Н., Короев Д.О., Обозная М.Б., Волкова Т.Д., Иванов В.Т. // Биоорган. химия. 2002. Т. 28. С. 387–395.

17. Vol'pina O.M., Titova M.A., Koroev D.O., Volkova T.D., Oboznaya M.B., Zhmak M.N., Alekseev T.A., Tsetlin V.I. // Russ. J. of Bioorganic Chemistry. 2006. V. 32. P. 154–159 (Вольпина О.М., Титова М.А., Короев Д.О., Волкова Т.Д., Обозная М.Б., Жмак М.Н., Алексеев Т.А., Цетлин В.И. // Биоорган. химия. 2006. Т. 32. С. 169–175).
18. Vol'pina O.M., Volkova T.D., Koroev D.O., Ivanov V.T., Ozherelkov S.V., Khoretonenko M.V., Vorovitch M.F., Stephenson J.R., Timofeev A.V. // Virus Res. 2005. V. 112. P. 95–99.
19. Cribbs D.H., Ghochikyan A., Vasilevko V., Tran M., Petrushina I., Sadzikava N., Babikyan D., Kesslak P., Kieber-Emmons T., Cotman C.W., Agadjanyan M.G. // Int. Immunol. 2003. V. 15. P. 505–514.
20. Knutson K.L., Schiffman K., Disis M.L. // J. Clin. Invest. 2001. V. 107. P. 477–484.
21. Finkelman F.D., Holmes J., Katona I.M., Urban J.F. Jr., Beckmann M.P., Park L.S., Schooley K.A., Coffman R.L., Mosmann T.R., Paul W.E. // Annu. Rev. Immunol. 1990. V. 8. P. 303–333.
22. Koroev D.O., Kotelnikova O.V., Vol'pina O.M., Zhmak M.N., Kuprianova M.A., Agafonova S.A., Alliluev A.P., Litvinov I.S., Nesmeyanov V.A., Ivanov V.T. // Russ. J. of Bioorganic Chemistry. 2000. V. 26. P. 291–296 (Короев Д.О., Котельникова О.В., Вольпина О.М., Жмак М.Н., Куприянова М.А., Агафонова С.А., Аллилуев А.П., Литвинов И.С., Несмеянов В.А., Иванов В.Т. // Биоорган. химия. 2000. Т. 26. С. 323–329).

Antitumor Immunotherapy with the Use of Synthetic Fragments of Survivin

T. D. Volkova^{a#}, D. O. Koroev^a, M. A. Titova^a, M. B. Oboznaya^a, M. P. Filatova^a, A. A. Pankratov^b, N. B. Morozova^b, Yu. B. Zolotavkina^b, R. I. Yakubovskaya^b, and O. M. Volpina^a

[#] Phone: +7 (495) 336-5777; e-mail: tdvol@ibch.ru

^a Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

^b Gertsen Research Institute of Oncology, Moscow, Russia

The endogenous protein survivin is present in tumor cells and inhibits apoptosis. The influence of vaccination of mice by survivin fragments on growth of various types of tumors was studied to examine the possibility of creation of an antitumor vaccinating agent on its basis. Two peptides corresponding to the 118–144 and (80–88)–(153–165) sequences of survivin 2B were chosen and synthesized on the basis of literature data and theoretical calculations. Their ability to stimulate antibody production in mice of the C57BL/6J line (b haplotype) and in BDF1 hybrids (b × d haplotype) was investigated. Both peptides were shown to stimulate production of antibodies that bound the recombinant survivin in the BDF1 mice. Immunization of the BDF1 and C57BL/6J mice with the recombinant survivin resulted in the formation of antibodies that reacted with the 118–144 peptide. The effect of preventive vaccination with the peptides and the recombinant protein on the dynamics of growth of several species of tumors was studied. Vaccination with the (80–88)–(153–165) peptide was found to cause an antitumor effect in BDF1 mice suffering from sarcoma S-37. Thus, the creation of an antitumor agent on the basis of this peptide is a promising area of further studies. The English version of the paper: Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2008, vol. 34, no. 4; see also <http://www.maik.ru>

Key words: antibodies, antitumor immunotherapy, survivin, synthetic peptides, T-epitopes