

УДК 612.432.018

ИММУНОЛОГИЯ

Л. М. БЕРШТЕЙН, А. Л. РЕМИЗОВ, Б. Н. СОФРОНОВ, В. М. ДИЛЬМАН  
**АНАГОРМОНЫ-ХИМЕРЫ. ГОРМОНАЛЬНО-НЕАКТИВНЫЙ  
КОНЬЮГАТ БЫЧЬЕГО АКТГ И СОМАТОТРОПИНА ЧЕЛОВЕКА,  
СОХРАНЯЮЩИЙ АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА ИСХОДНЫХ  
ГОРМОНОВ**

(Представлено академиком В. Н. Черниговским 17 V 1971)

Различная пространственная локализация гормонального и иммунологического центров в белковой молекуле гормона лежит в основе получения анагормонов-антигенов (<sup>1,2</sup>). Новые возможности в этом отношении открывает метод сшивки гормонов, в частности с помощью водорастворимых карбодиимидов (КДМ). Обычно КДМ используются с целью усиления иммуногенности малых полипептидных гормонов путем присоединения последних к негормональному белку-носителю (как правило, сывороточному альбумину или глобулину). В результате подобной сшивки конъюгат может утратить гормональную активность, но сохранить иммунологические свойства гормона-гаптена (<sup>3,4</sup>), т. е. по своим характеристикам соответствовать анагормону-антигену. В настоящей работе принцип сшивки впервые использован для соединения разноименных гормонов, т. е. для получения анагормона-химеры — гормонально-неактивного конъюгата АКТГ быка и человеческого СТГ (АКС). Этим путем мы пытались как повысить иммуногенность пептидной молекулы АКТГ, так и создать препарат, пригодный для одновременной иммунизации двумя анагормонами, полученными в результате конъюгирования.

Материалы и методы. Бычий АКТГ (активность 20 ед/мг) получали на Ленинградском мясокомбинате, СТГ из гипофизов человека выделяли по (<sup>5</sup>). Для получения АКС использовали метил-*n*-толуолсульфонат-1-циклогексил-3-(2-морфолинил-(4)-этил)-карбодиимид, синтезированный в Институте органической химии СО АН СССР (Новосибирск). 5 мг СТГ растворяли в 0,1 мл *N* NaOH, добавляли 15 мг АКТГ и доводили объем растворителя до 1,0 мл. К раствору гормонов при постоянном помешивании приливали раствор 100 мг КДМ в 1,0 мл дистиллированной H<sub>2</sub>O и оставляли при комнатной температуре. Через 30 мин. смесь переносили в диализационную камеру и диализовали против дистиллированной воды в течение 48 час. при 4°. Полученный продукт подвергали проверке на стероидогенную (по методу (<sup>6</sup>)), ростовую (в тибальном тесте по (<sup>7</sup>)) и жиромобилизующую (по изменению концентрации неэтерифицированных жирных кислот (НЭЖК) в крови (<sup>8</sup>)) активности. Иммунологические свойства конъюгата изучались в реакциях связывания компонента, преципитации и торможения пассивной геммагглютинации (<sup>9-11</sup>). Количество взятого для того или иного исследования конъюгата исчисляли на основании весовых значений входящих в него гормональных компонентов. С целью получения иммунной сыворотки к АКС последний (в дозах, соответствующих 0,6—1,2 мг СТГ и 1,8—3,6 мг АКТГ) в смеси с полным адъювантом Фрейнда вводили кроликам-самкам с интервалом в 10—14 дней подкожно в область подмышечных и паховых лимфатических узлов. Кровь для определения титра антител брали на 10—11 день после IV—VI введений антигена.

Результаты. Гомогенность АКС была продемонстрирована при изучении его методами тонкослойной и колоночной хроматографии на сефадексе Г-50 и Г-75, а также при анализе конъюгата в ультрацентрифуге (максимальная скорость до 49 000 об/мин). При биологическом тестировании АКС выяснилось, что он лишен стероидогенной и ростовой активности (табл. 1, 2). Помимо этого, при внутривенном введении кроликам АКС не повышал концентрацию НЭЖК в крови, т. е., в противоопо-

Т а б л и ц а 1

Результаты изучения стероидогенной активности в тесте на заблокированных дексаметазоном крысах

Препарат	Число животных	Концентрация кортикостерона в крови, $\mu\text{г}\%$
Физиологический раствор (0,2 мл)	12	$5,3 \pm 0,7$
АКТГ (1 м. ед.)	10	$11,4 \pm 0,6$
АКТГ (2 м. ед.)	6	$16,1 \pm 1,1$
АКС (1,5—6 м. ед.)	10	$6,1 \pm 0,7$
АКТГ (1 м. ед.) + нормальная* кроличья сыворотка (0,3 мл)	4	$12,4 \pm 0,2$
АКТГ (1 м. ед.) + иммунная** сыворотка к АКС (0,3 мл)	6	$3,4 \pm 0,7$

\* Инкубация производилась в течение 20 час., при 4°.

\*\* Все препараты вводились в хвостовую вену под нембуталовым наркозом. Кровь для исследования бралась через 20 мин. после введения препарата.

ложность АКТГ и СТГ, их конъюгат, полученный вышеуказанным образом, не обладал и жиромобилизующим действием.

Несмотря на отсутствие гормональной активности в конъюгате АКТГ и СТГ, иммунологический анализ показал, что АКС сохраняет присущую как АКТГ, так и СТГ антигенную характеристику, реагируя с иммунными сыворотками к этим гормонам в реакциях гемагглютинации, пре-

Т а б л и ц а 2

Результаты изучения ростовой активности в тиббальном тесте на заблокированных гидрокортизоном крысах

Группа	Число крыс	Ширина тиббального хряща, $\mu$
Контроль	27	$267,4 \pm 5,0$
Гидрокортизон (1,5 мг×3)	26	$152,5 \pm 5,1$
Гидрокортизон + СТГ (0,2—0,3 мг×3)	23	$201,5 \pm 6,8$
Гидрокортизон + АКС (0,6 мг×3)	9	$142,7 \pm 8,1$
Гидрокортизон + (СТГ + нормальная кроличья сыворотка)	9	$202,1 \pm 2,5$
Гидрокортизон + (СТГ + иммунная сыворотка к АКС)	8	$163,4 \pm 5,3$

П р и м е ч а н и е. СТГ инкубировался с сыворотками в течение 20 час. при 4° из расчета 0,25 мл сыворотки на 0,3 мг гормона.

ципитации в геле и РСК в тех же количественных соотношениях, что и исходные гормоны. С другой стороны, антисыворотка, выработанная на АКС, реагировала как с самим АКС, так и с составляющими его гормональными компонентами и обладала способностью нейтрализовать гормональное действие АКТГ и СТГ (табл. 1, 2).

Обсуждение результатов. Путем конъюгирования с помощью КДМ слабого антигена, близкого по своим свойствам к гаптепу, — бычьего АКТГ с сильным антигеном — СТГ человека удалось получить неактивный в гормональном отношении конъюгат, обладающий антигенными характеристиками исходных гормонов. Это позволило обозначить полученный препарат как анагормон-химеру. Преимущество да-

ного своеобразного типа анагормонов заключается в том, что при активной иммунизации конъюгатами двух (или, в будущем, большего числа) разноименных гормонов создается возможность одновременного воздействия на различные железы внутренней секреции. Кроме того, сшивка двух разноименных гормонов с разной степенью антигенности позволяет усилить антигенные свойства слабого антигена. Использование негормональных белков-носителей животного происхождения с этой целью невозможно, если иметь в виду в дальнейшем иммунизацию человека, из-за аллергенности чужеродного белка-носителя. Изложенный нами принцип получения анагормонов-химер может быть использован и для таких вариантов, где в качестве гаптена будут применены стероидные гормоны. В частности, большой интерес представляет получение конъюгата человеческого СТГ с эстроном (или другим эстрогеном), работа над которым ведется в нашей лаборатории. Кроме того, возможны сшивки одноименных белковых гормонов (полимеризация) для усиления антигенности анагормонов, а также сшивка гормонов с антигенами из опухолевой ткани (в частности, АКТГ и антигена из рака легкого с целью проведения активной иммунизации как при обычных, так и АКТГ-продуцирующих опухолях легких).

Научно-исследовательский  
институт онкологии  
Ленинград

Поступило  
18 V 1971

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> V. M. Dilman, Intern. J. Cancer, **1**, 239 (1966). <sup>2</sup> В. М. Дильман, Старение, климакс и рак, Л., 1968. <sup>3</sup> T. Goodfriend, L. Levine, G. Fasman, Science, **144**, 1344 (1964). <sup>4</sup> J. Mcquire, R. McGill, T. Goodfriend, J. Clin. Invest., **44**, 1672 (1965). <sup>5</sup> M. Raben, Science, **125**, 883 (1957). <sup>6</sup> H. Purves, N. Sirett, Endocrinology, **77**, 366 (1965). <sup>7</sup> И. А. Эскин, Н. В. Михайлова, Бюлл. эксп. биол. и мед., **3**, 403 (1959). <sup>8</sup> V. Dole, Proc. Soc. Exp. Biol. u. Med., **93**, 532 (1956). <sup>9</sup> В. И. Иоффе, К. М. Розенталь, Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол., **12**, 65 (1943). <sup>10</sup> А. И. Гусев, В. С. Цветков, Лаб. дело, **2**, 43 (1961). <sup>11</sup> C. H. Read, D. B. Stone, Am. J. Dis. Child., **96**, 538 (1958).