

Л. М. БЕРШТЕЙН, С. В. ПАТОКИН, Л. М. ХАЧАТУРЯН,
В. Н. ГОЛУБЕВ, В. М. ДИЛЬМАН

**АНАГОРМОНЫ-ХИМЕРЫ. КОНЪЮГАТЫ
МЕЛАНОЦИТОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ГОРМОНА ГИПОФИЗА (МСГ)
С АНТИГЕНАМИ ИЗ МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА**

(Представлено академиком Е. М. Крепсом 20 II 1974)

В предыдущих исследованиях были разработаны методы получения конъюгатов некоторых разноименных гормонов и изучены свойства конъюгатов соматотропина человека с бычьим АКТГ и эстроном (2, 3). Препараты такого рода, сохраняющие антигенную характеристику исходных гормонов, но лишённые специфического гормонального действия, были обозначены как анагормоны-химеры (5).

Одной из разновидностей данного класса анагормонов может быть конъюгат определенного гормона с опухолевым антигеном. Тем самым, с одной стороны, будет, по всей видимости, осуществлен «принцип гетерогенизации», сводящийся к приданию опухолевому антигену дополнительных антигенных свойств (8, 10, 15), а с другой — при активной иммунизации конъюгатом такого рода можно ожидать индуцирования антител, одновременно воздействующих как на гормональный, так и на опухолевый субстрат.

Настоящая работа посвящена описанию одного из возможных способов получения подобных препаратов. Для исследования была избрана меланома человека, так как этот вид опухоли является вероятным носителем специфического опухолевого антигена (15) и, с другой стороны, очевидно, подвержен определенным гормональным влияниям (прежде всего, МСГ) (7).

Экстракцию и осаждение МСГ из свежзамороженных свиных гипофизов проводили по методике (13). Так называемый растворимый — АГ_р (надосадочная фракция водно-солевого экстракта опухолевой ткани) и клеточный — АГ_{кл} (полученный в результате трипсинизации опухолевого материала) антигены готовили из ткани меланомы, взятой во время операции (17 больных). При получении конъюгата МСГ с АГ_р (МАГ_р) использовали метил-*n*-толуолсульфонат-1-цикло-гексил-3-(2-морфолинил-(4)-этил)-карбодимид («Bonnasies», Франция). К 10 мг МСГ в 1 мл H₂O и 0,5 мл (~10 мг по белку) антигена приливали при постоянном перемешивании 100 мг карбодимид в 1 мл воды. Через 30 мин. смесь переносили в диализационную камеру и диализовали против дистиллированной воды при 4° в течение 96—120 час. Связывание МСГ и АГ_{кл} производили с помощью бисдиазобензидина. 10 мг МСГ растворяли в 1 мл 0,4 М фосфатного буфера, рН 7,4, приливали 0,15—0,2 мл суспензии клеток (~100 мг сырого веса ткани) меланомы в физиологическом растворе и добавляли 0,1 мл (~16 мкмол.) бисдиазобензидина. Смесь периодически встряхивали в течение 10 мин. при комнатной температуре и оставляли на ночь при 4° для отделения темно-коричневых хлопьев конечного продукта (МАГ_{кл}).

Определение биологической (меланофорной) активности МСГ и его конъюгатов с антигенами из меланомы основывалось на измерении реакции кожи лягушек *R. temporaria* в опытах *in vitro* (14) и *in vivo* (17).

Оценка липолитической активности препаратов производилась по изменению концентрации НЭЖК⁽¹⁴⁾ в крови подошпытных кроликов. Иммунологические свойства МСГ и конъюгатов изучались в различных модификациях реакции пассивной гемагглютинации^(9, 16). С целью получения иммунсывороток 0,5 мл МАГ_р или дважды отмытый физиологическим раствором и суспендированный в 0,5 мл последнего МАГ_{кл} смешивали с равным объемом полного адьюванта Фрейнда и 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 III, VI и VIII введения антигенов. По этой же схеме производили иммунизацию кроликов МСГ, смешанным с углем (10 мг МСГ+0,5 мл Н₂O+ +5 мг мелкого угля (тщательно перемешанный!)+0,5 мл адьюванта Фрейнда).

В предварительных экспериментах выяснилось, что минимальная эффективная доза имеющегося в нашем распоряжении МСГ при тестировании его меланофорной активности *in vitro* составляет 3 мкг. В то же время 400 мкг (в пересчете на МСГ) МАГ_р были полностью лишены меланофорной активности, а 1200 мкг этого конъюгата стимулировали пигментобразование лишь в очень небольшой степени (табл. 1).

Поскольку МАГ_{кл} плохо растворим, оценка его меланофорной активности производилась в экспериментах *in vivo*. Выяснилось, что потеря этим конъюгатом способности вызывать потемнение кожи лягушки может возникнуть уже на стадии обработки бисдиазобензидином (табл. 2). МАГ_р и в этих экспериментах сохранял очень небольшую гормональную активность, что соответствовало данным, полученным *in vitro*.

Таблица 1

Определение меланофорной активности МСГ и МАГ_р в опытах *in vitro*

Препарат	Суммарная доза, мкг	Число определений	Увеличение оптической плотности кожи лягушек (M ± m)
МСГ	3	36	0,03 ± 0,01
МСГ	200	12	0,25 ± 0,02
МАГ _р	400	12	-0,007 ± 0,001
МАГ _р	1200	12	0,05 ± 0,01

Таблица 2

Изучение меланофорной активности МСГ и его конъюгатов в опытах *in vivo*

Препарат	Доза, мкг	Число лягушек	Реакция ⁽¹⁸⁾
Контроль	—	3	—
МСГ	30—100	9	+++
МСГ — БДБ *	100—1000	4	—
МАГ _{кл}	200—1000	7	—
МАГ _р	1000	3	—
МСГ + иммунсыв. к МАГ _р **	30	3	+
МСГ + иммунсыв. к МАГ _{кл} **	30	3	+

* Продукт обработки МСГ бисдиазобензидином.

** МСГ инкубировали в течение 20 час. при 4° с γ-глобулином, выделенным из 3—3,5 мл иммунсыворотки.

С другой стороны, как МАГ_р, так и МАГ_{кл} не обладали в испытанных дозах липолитическим действием, которое свойственно нативному МСГ (рис. 1).

Сохранение в том и другом типе конъюгата присущих МСГ и опухолевым антигенам свойств доказывалось: а) способностью МАГ_р тормозить реакцию МСГ с иммунсывороткой к нему в тех же количественных соотношениях, что и МСГ; б) продукцией в ходе иммунизации кроликов МАГ_р и МАГ_{кл} трех видов антител: к МСГ, антигенам меланомы и к са-

мим конъюгатам (табл. 3); в) способностью иммунсыворотки к конъюгатам ингибировать в определенной степени как меланофорное (табл. 2), так и липолитическое (рис. 1) действие МСГ.

Таким образом, в результате конъюгирования МСГ с так называемым растворимым или клеточным антигеном меланомы* было получено 2 типа конъюгатов (МАГ_р и МАГ_{кл}), сохраняющих антигенные свойства исходных субстанций и в значительной степени утративших присущее МСГ гормональное действие. В связи с тем, что последнее обстоятельство в

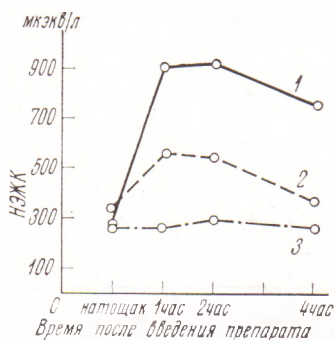


Рис. 1. Изучение липолитической активности МСГ и его конъюгатов. Подкожное введение препаратов кроликам (3–7 животных в каждой группе), голодавшим в течение 12–14 час. Инкубация иммунсыворотки с МСГ производилась в течение 20 час. при 4°. 1 — МСГ (0,25–1 мг), 2 — МСГ (0,5 мг) + иммунсыворотка к МАГ, 3 — МАГ (2–5 мг по МСГ)

большей степени относится к МАГ_{кл}, а также благодаря тому, что в АГ_{кл} практически могут содержаться все входящие в АГ_р антигенные компоненты, использование в дальнейшем в клинических целях именно МАГ_{кл} более желательно. Естественно, что переход от клиническому этапу данной работы требует дополнительных экспериментальных исследований, направленных, в частности, на изучение противоопухолевых свойств получаемых иммунсывороток. Следует также учитывать степень специфичности выделяемых с целью конъюгирования с гормонами опухолевых антигенов. Здесь, наряду с антигеном из меланомы, заслуживают упоминания так называемые карцино-эмбриональные антигены, обнаруживаемые в опухолях толстой кишки⁽¹²⁾, поскольку возможная гормонозависимость этого вида злокачественных новообразований^(1, 4) делает необходимой и

Таблица 3

Динамика титров антител к МСГ, меланомному антигену и МАГ_р в ходе иммунизации МАГ_р и МАГ_{кл} (по данным реакции пассивной гемагглютинации)

Конъюгат	Иммунсыворотка к МАГ _р			Иммунсыворотка к МАГ _{кл}		
	МСГ	АГ _р	МАГ _р	МСГ	АГ _р	МАГ _р
III	1/12800	1/400	1/12800	1/2000	1/3200	1/8000
VI	1/32000	1/64000	1/128000	1/6000	1/32000	1/12000
VIII	1/64000	1/256000	1/256000	1/32000	1/64000	1/32000

своевременную разработку соответствующих терапевтических мероприятий. Может, однако, оказаться целесообразным и получение гормонов на основе антигенов, обладающих меньшей специфичностью (нами совместно с Б. Н. Софроновым предпринимаются, например, попытки получения и изучения свойств комплекса СТГ с антигеном из ткани рака молочной железы), при условии дифференцированного истощения этих конъюгатов перед иммунизацией. Не следует рассматривать как препятствие и то обстоятельство, что некоторые опухолевые антигены не являются белками,

* Препарат подобного типа может быть обозначен как «горморан» (гормон + раковый антиген).

поскольку в этом случае они обладают гаптенными свойствами (⁶) и, очевидно, тоже при необходимости могут быть конъюгированы с гормонами.

Таким образом, как анагормоны-химеры типа гормон+раковый антиген, так и принципы, лежащие в основе получения подобного рода препаратов, должны, по нашему мнению, рассматриваться как один из возможных подходов к проблеме терапевтического воздействия на опухолевый рост и способствующие ему нарушения в деятельности эндокринной системы.

Научно-исследовательский институт онкологии
им. Н. Н. Петрова
Ленинград

Поступило
12 II 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Л. М. Берштейн, *Вопр. онкол.*, т. 3, 48 (1973). ² Л. М. Берштейн, А. Л. Ремизов и др., *ДАН*, т. 203, 1, 219 (1972). ³ Л. М. Берштейн, Б. Н. Софронов и др., *Бюлл. эксп. биол. и мед.*, № 2, 85 (1973). ⁴ И. А. Васильева, В. М. Дильман, *Вопр. онкол.*, № 3, 35 (1973). ⁵ В. М. Дильман, *Соврем. вопр. онкол.*, Л., 1971, стр. 20. ⁶ В. С. Коростелева, *Специфические антигены раковых опухолей человека*. Автореф. докторской диссертации, М., 1971. ⁷ О. Миодушевска, *Тр. VIII Международн. противораков. конгр.*, т. 3, 1963, стр. 469. ⁸ Г. Я. Свет-Молдавский, В. П. Гамбург, *Бюлл. эксп. биол. и мед.*, № 9, 85 (1965). ⁹ S. V. Boyden, *J. Exp. Med.*, v. 93, 107 (1951). ¹⁰ N. P. Czajkowski, M. Rosenblatt et al., *Lancet*, v. 2, 905 (1967). ¹¹ E. H. Frieden, J. W. Fishbein, G. L. Hisaw, *Arch. Biochem.*, v. 17, 183 (1948). ¹² P. Cold, *Exp. Tumor Res.*, v. 14, 43 (1971). ¹³ D. P. Island, N. Shimizu, W. Nicholson, *J. Clin. Endocrinol.*, v. 25, 975 (1965). ¹⁴ S. Laurell, G. Tibbling, *Clin. chim. acta*, v. 16, 57 (1967). ¹⁵ D. Morton, *Cancer*, v. 30, 1647 (1972). ¹⁶ C. H. Read, D. B. Stone, *Am. J. Disc. Child.*, v. 96, 538 (1958). ¹⁷ F. Sulman, *Acta endocrinol.*, v. 10, 320 (1952). ¹⁸ E. Thing, *Acta endocrinol.*, v. 10, 295 (1952).