

УДК 541(13+64)

ОТ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ К ПОЛИМЕР-СУБЪЕДИНИЧНЫМ ВАКЦИНАМ¹ (Обзор)

© 2004 г. В. А. Кабанов

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Химический факультет

119992 Москва, Ленинские горы

Дан обзор многолетних исследований в области применения синтетических полиэлектролитов в иммунологии. Было обнаружено, что линейные синтетические полиэлектролиты самого различного строения, не являющиеся структурными аналогами биополимеров, а потому незнакомые иммунной системе, оказывают на нее очень существенное влияние при введении в организм. Они заметно интенсифицируют образование в костном мозге, последующую миграцию и расселение в организме стволовых клеток – предшественников всех функциональных иммунных клеток. Кроме того, синтетические полиэлектролиты, сами не будучи антигенами, при введении совместно с типичными антигенами (белками, природными микробными полисахаридами и их синтетическими аналогами) в несколько раз усиливают выработку антител, комплементарных введенным антигенам, т.е. служат в качестве стимуляторов иммунного ответа. В дальнейшем было показано, что синтетические полиэлектролиты запускают иммунную систему по механизму, обычно не используемому природой. Поэтому эффективность защитной реакции организма становится неподконтрольной генам иммунного ответа: у плохо и хорошо генетически защищенных особей он оказывается одинаково сильным. В основе альтернативного запуска лежит общее свойство линейных полиэлектролитов агрегировать сорбируемые ими белки (в данном случае те, что встроены в клеточные мембранные В-клеток, синтезирующих антитела). Был разработан нетоксичный иммуностимулятор: сополимер 1,4- этиленпиперазин-N-оксида и (N-карбоксиметилен)-1,4- этиленпиперазиний бромида (фирменное название “Полиоксидоний”), разрешенный для введения человеку. Однако кардинальным шагом на пути к вакцинам нового поколения стало обнаружение биологического эффекта конъюгирования синтетических полиэлектролитов с микробными антигенами. В отличие от простых смесей конъюгаты усиливают иммунный ответ в десятки и сотни раз. При этом предварительная иммунизация защищает животных от абсолютно смертельных доз соответствующих бактерий и вирусов. Коньюгат “полиоксидоний” с гемагглютинином и нейраминидазой (белковыми субъединицами вируса гриппа) стал первой в мире непастеровской вакциной “Гриппол”, успешно применяемой в России (около 50 млн. прививок в последние 7 лет). В обзоре рассмотрены физико-химические механизмы биологического действия упомянутых соединений и перспективы дальнейшего использования разработанного подхода.

ВВЕДЕНИЕ

30 с небольшим лет назад случай свел меня с Рэром Петровым, к тому времени уже видным иммунологом. Оба мы были еще молоды и не отягощены традиционным мышлением. А потому решили дерзнуть и не поленились проверить возникшую у нас, как многим в ту пору показалось бы, пустую идею: использовать синтетические полиэлектролиты (СПЭ), не являющиеся да-

же далекими аналогами биополимеров, в качестве компонентов для целенаправленного воздействия на иммуногенез. К тому времени было уже хорошо известно, что чужеродные природные полиэлектролиты (белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты) и их структурные синтетические аналоги (полипептиды, полинуклеотиды), попав в организм, проявляют свойства антигенов. Это значит, что иммунные клетки узнают их специфические фрагменты (антигенные детерминанты) и в ответ вырабатывают структурно комплементарные белки – антитела, которые блокируют эти антигены. Было известно также, что природные полиэлектролиты (полисахариды, нативные нуклеиновые кислоты, двусpirальные

¹ Пленарная лекция на 17-м Менделеевском съезде по общей и прикладной химии, Казань, 21–26 сентября 2003 г.

E-mail: Kabanov@genebee.msu.ru (Кабанов Виктор Александрович).

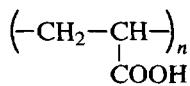
синтетические полинуклеотиды), кроме того, активируют иммунную систему по отношению к другим антигенам, т.е. служат в качестве иммуностимуляторов [1–3]. Нам же захотелось узнать, как иммунная система реагирует на незнакомые ей СПЭ, химическая структура которых ничем не напоминает биополимеры. Тогда я передал иммунологам два простых СПЭ винилового ряда, которые в тот момент оказались под рукой: полиакриловую кислоту (**ПАК**) и поли-4-винилпиридин (**ПВП**). Первый полимер способен диссоциировать в водной среде с образованием полиионов, второй – присоединять протоны, образуя соответствующие поликатионы. Эти полимеры мы тогда готовили в достаточно больших количествах и изучали на кафедре высокомолекулярных соединений химического факультета МГУ, преследуя совершенно иные цели.

АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ МЕХАНИЗМ АКТИВАЦИИ ИММУННЫХ КЛЕТОК

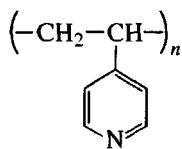
Заслуживающие внимания результаты были получены уже в первых сериях опытов, проведенных на мышах. Как и следовало ожидать, незнакомые организму молекулярные цепи ПВП и ПАК сами по себе не были иммуногенны. Однако введение их водных растворов в кровь заметно интенсифицировало образование в костном мозге так называемых стволовых клеток – предшественников всех функциональных клеток иммунной системы, их миграцию и расселение в организме [4]. Кро-

ме того, оказалось, что и ПАК и ПВП, не будучи антигенами, при введении совместно с эритроцитами барана в несколько раз усиливают иммунный ответ на этот типичный тестовый антиген, т.е. служат в качестве иммуностимуляторов [5]. На самом деле иммуностимулирующее действие ПАК *in vivo* еще несколько ранее было обнаружено Diamanstein и др., испытавшими ее наряду с многочисленными природными полиионами [6]. Тогда они не придали этому факту особого значения. Нам же при анализе наших данных показалось удивительным, что полиионы ПАК и ПВП, цепи которых построены из мономерных звеньев различного химического строения и даже различаются знаком заряда, тем не менее, примерно в одинаковой степени стимулируют иммунный ответ.

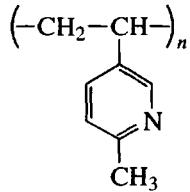
На этом этапе стало ясно, что игра стоит свеч и проблема заслуживает дальнейшей разработки в качестве специального проекта. Тогда мы организовали группу из нескольких химиков – выпускников химического факультета МГУ и иммунологов из числа учеников Р.В. Петрова, среди которых Р.М. Хайтов вскоре стал играть ведущую роль. Усилия группы были целиком направлены на синтез и выяснение механизма действия СПЭ как иммуностимуляторов. Расширяя круг СПЭ, мы убедились, что подобно ПВП и ПАК действуют и многие другие химические структуры. Ниже приведены формулы лишь некоторых из них.



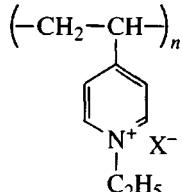
Полиакриловая кислота



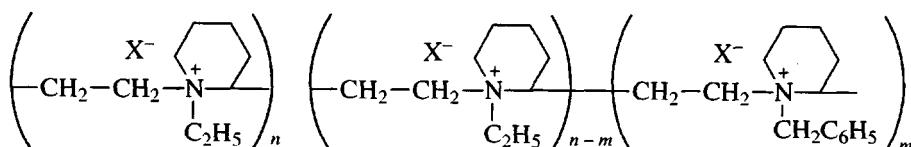
Поли-4-винилпиридин



Поли-2-метил-5-винилпиридин



Четвертичная соль
поли-4-винилпиридина



Поликатион 1

Поликатион 2

Четвертичные соли поликонидия

Все изображенные выше полиэлектролиты в несколько раз усиливали иммунный ответ мышь на эритроциты барана. Дальнейшие исследования показали, что структурное разнообразие потенциальных иммуностимуляторов в ряду СПЭ практически не ограничено.

Этот неожиданный результат позволил предположить, что различные СПЭ действуют на иммунную систему по какому-то общему механизму, связанному с их полимерной природой, в частности со способностью макромолекул СПЭ к многоцентровому взаимодействию с иммунными клетками. Предположение подтвердилось. Рисунок 1 показывает, что низкомолекулярные аналоги типичных СПЭ-иммуностимуляторов не проявляют никакой активности при испытаниях *in vivo*. Эффект возникает лишь по достижении некоторых достаточно высоких значений степени полимеризации [7–9].

Известно, что для запуска естественного процесса выработки антител в организме требуется весьма сложное специфическое взаимодействие (кооперация) нескольких разновидностей иммунных клеток [10, 11]. Упрощенная схема такой кооперации представлена на рис. 2 [10]. Основные ее участники: Т-лимфоциты-помощники (T_h), антигепредставляющие клетки (APC) (макрофаги – одна из их разновидностей), а также В-лимфоциты – клетки, производящие антитела. Все они формируются путем дифференциации расселившихся стволовых клеток. T_h -лимфоциты формируются в тимусе (зобной железе). В ходе формирования и развития они “обучаются” отличать попавшие в организм чужие антигены от своих собственных тканей (верхняя часть схемы). Для этого клетка синтезирует белковые рецепторы, которые располагаются на ее поверхности. Рецептор каждого T_h -лимфоцита способен участвовать в узнавании только одного антигена, вернее его характеристического фрагмента – антигенных детерминанты. Столь же специфичные узнавающие рецепторы присутствуют и на поверхности В-лимфоцитов, сформировавшихся в костном мозге. Однако между рецепторами В- и T_h -клеток существует принципиальное различие. Первый самостоятельно узнает структурно комплементарную ему антигенному детерминанту. Второму для узнавания необходим соучастник – пептид строго определенной структуры (двойное узнавание). Структура эта запограммирована в генах

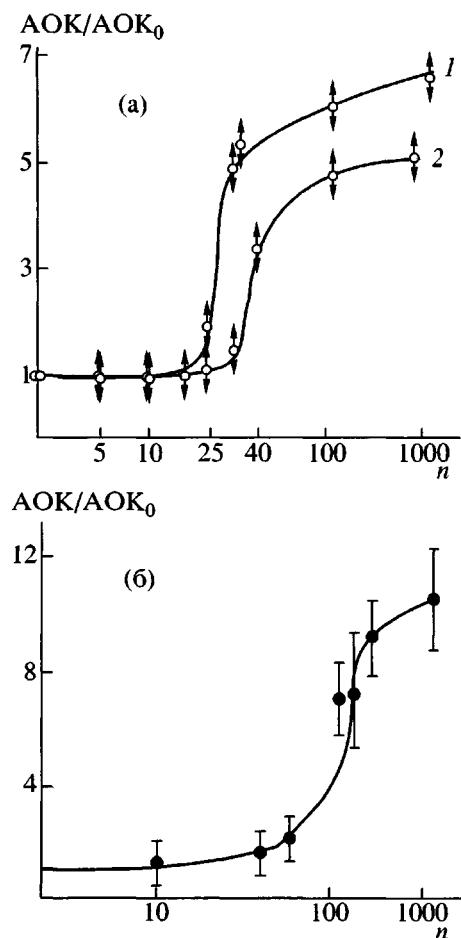


Рис. 1. Зависимость относительного числа АОК в селезенке мышей от степени полимеризации поликатиона 1 (1), поликатиона 2 (2) (а) и ПАК (б). Доза антигена (эритроцитов барана) 5×10^6 , доза иммуностимулятора 50 мг/кг.

иммунного ответа (IR-генах), которые входят в состав главного комплекса гистосовместимости. Иными словами, чтобы T_h -лимфоцит узнал чужой антиген, геном данной особи должен содержать соответствующий IR-ген. Попавший в организм антиген захватывается APC-клеткой. Там он расщепляется на фрагменты, пригодные для взаимодействия с узнавающими рецепторами T_h - и В-лимфоцитов. Там же с участием IR-гена синтезируется упомянутый выше вспомогательный пептид. Затем APC-клетка представляет T_h -лимфоциту узнаваемую им комбинацию, состоящую из фрагмента антигена и IR-ген зависимого пептида, а В-лимфоциту – только узнаваемый им антигенный фрагмент. Создавшаяся таким образом стартовая ситуация изображена в средней части схемы рис. 2. В этой ситуации T_h -лимфоцит посы-

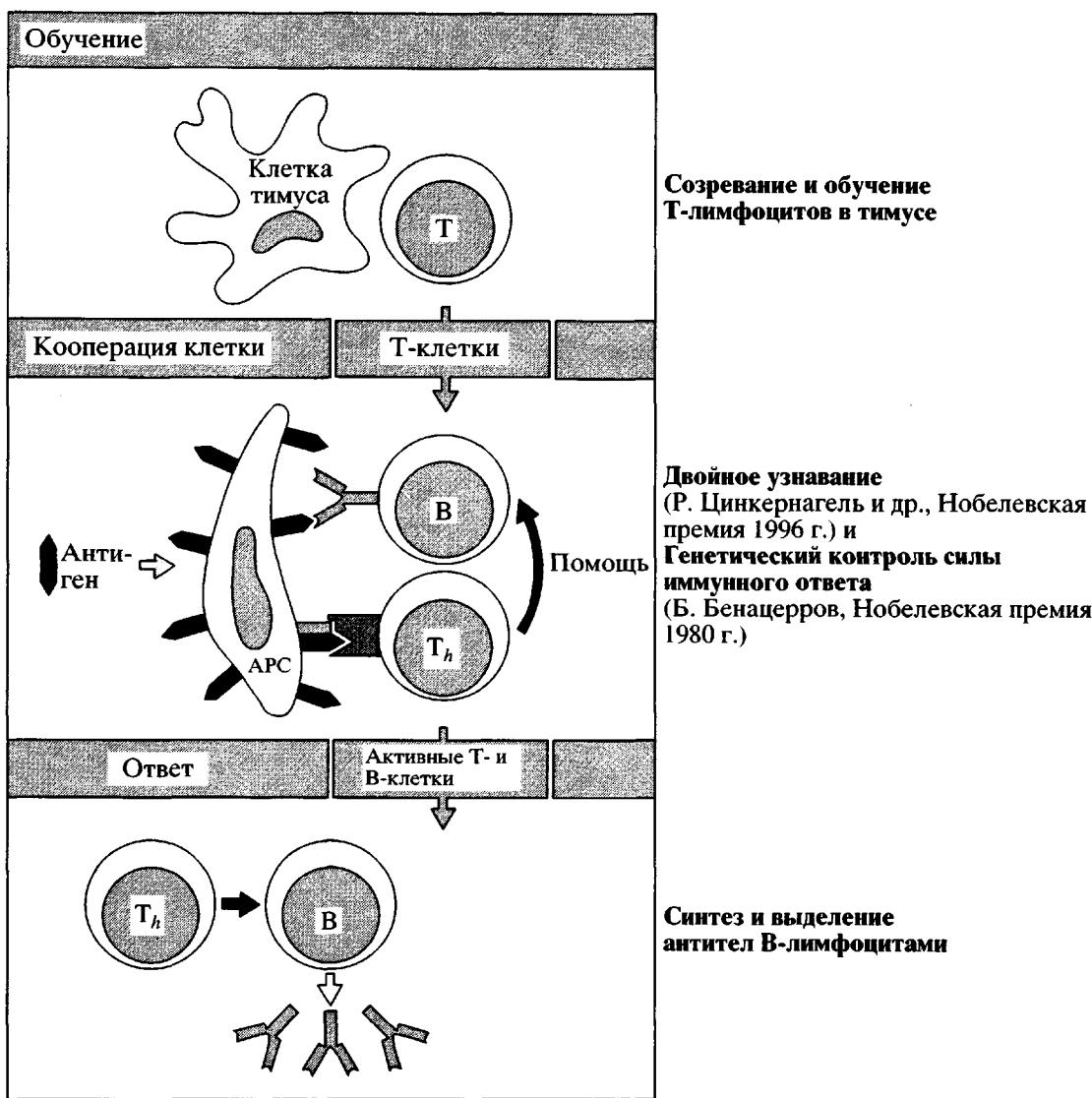


Рис. 2. Взаимодействие иммунных клеток при образовании специфических антител в ответ на введение антигена [10].

лаает в “помощь” В-лимфоциту сигнал в виде особого пептида-медиатора (цитокина). Лишь после получения такого сигнала В-лимфоциты начинают размножаться и продуцировать антитела, т.е. включается специфический иммунный ответ на попавший в организм антиген (нижняя часть схемы). Понятно, что иммунная система сможет довести до конца всю описанную выше цепь взаимосвязанных клеточных взаимодействий только, если в геноме присутствует необходимый IR-ген. В противном случае специфического иммунного ответа не будет. Именно на этом принципе основан существующий в природе генетический контроль силы иммунного ответа. Описанная обобщенная схема клеточной кооперации – один из

крайугольных камней современной иммунологии. Труды, послужившие ее созданию, в свое время были отмечены тремя Нобелевскими премиями по медицине.

Тем более удивительным представлялся нам еще один факт, который выявился в опытах *in vitro*. Небольшие количества СПЭ, добавленные к взвеси изолированных В-лимфоцитов, активировали синтез ДНК, вызывали деление, а в присутствии антигенов – антигензависимую дифференцировку клеток, т.е. запускали иммунный ответ прямо в пробирке без помощи других клеток иммунной системы [8, 9].

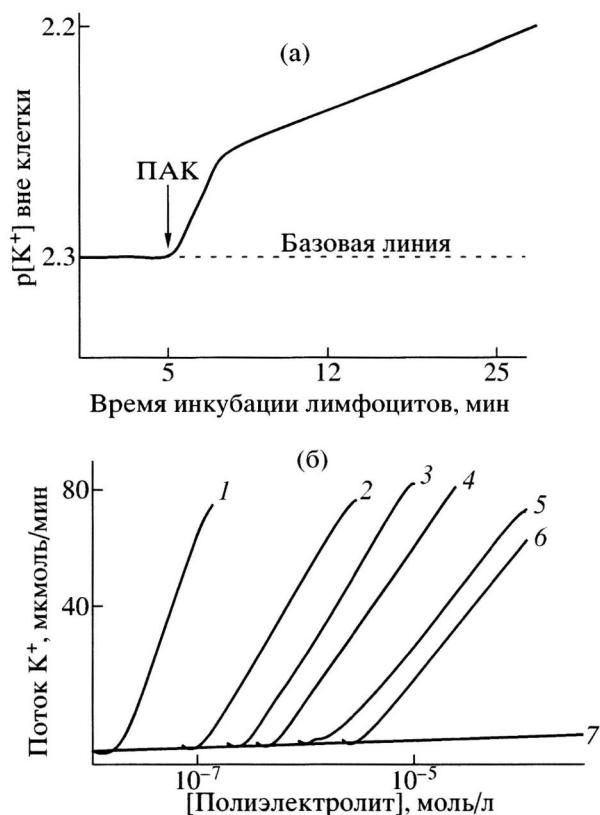


Рис. 3. Влияние полиелектролитов на проницаемость мембран В-лимфоцитов для ионов K^+ *in vitro*. а – Кинетика установления усиленного стационарного потока при добавлении в культуру клеток раствора ПАК; б – зависимость стационарных потоков ионов K^+ от концентрации различных полиелектролитов: 1 – ПЭП, 2 – ПЭП, содержащий 3 мол. % $C_{16}H_{33}$ -заместителей, 3 – поли-L-лизин, 4 – ПАК, 5 – диметиламиноэтилметакрилат, 6 – декстрамусульфат, 7 – поли-4-винилпиридиний-N-оксид (неионогенный полимер, приведенный для сравнения).

Объяснение было найдено путем изучения биохимических и физико-химических последствий воздействия СПЭ на В-лимфоциты. Оказалось, что при добавлении водного раствора ПАК к суспензии В-лимфоцитов резко возрастает ионная проницаемость внешней мембранны клетки. В частности, поток ионов калия устремляется из клетки в окружающий раствор, где их концентрация ниже, чем во внутриклеточном пространстве (рис. 3а). Другие водорастворимые СПЭ действуют аналогичным образом. В отличие от них водорастворимые электронейтральные полимеры никакой активности не проявляют (рис. 3б). Ионы кальция, концентрация которых выше в окружающем растворе, напротив, устремляются внутрь клетки (рис. 4). Иными словами, под воздействием

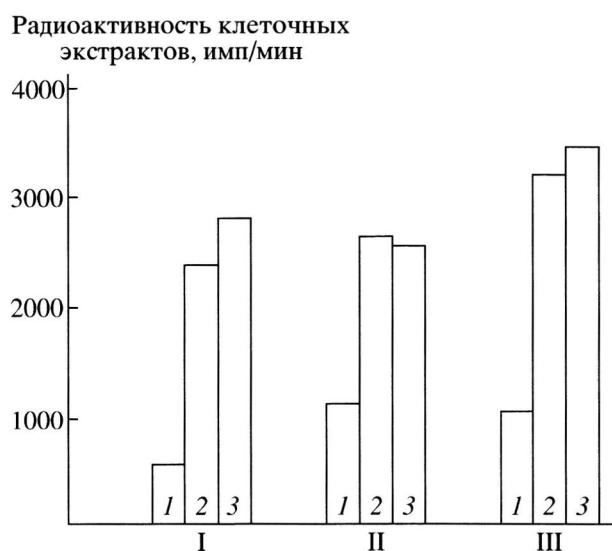


Рис. 4. Влияние полиелектролитов на прохождение экзогенных ионов Ca^{2+} сквозь мембранны В-лимфоцитов *in vitro*: 1 – контрольные клетки, 2 – ПАК ($n = 1100$), 3 – ПЭП ($n = 740$); I, II, III – номера опытов.

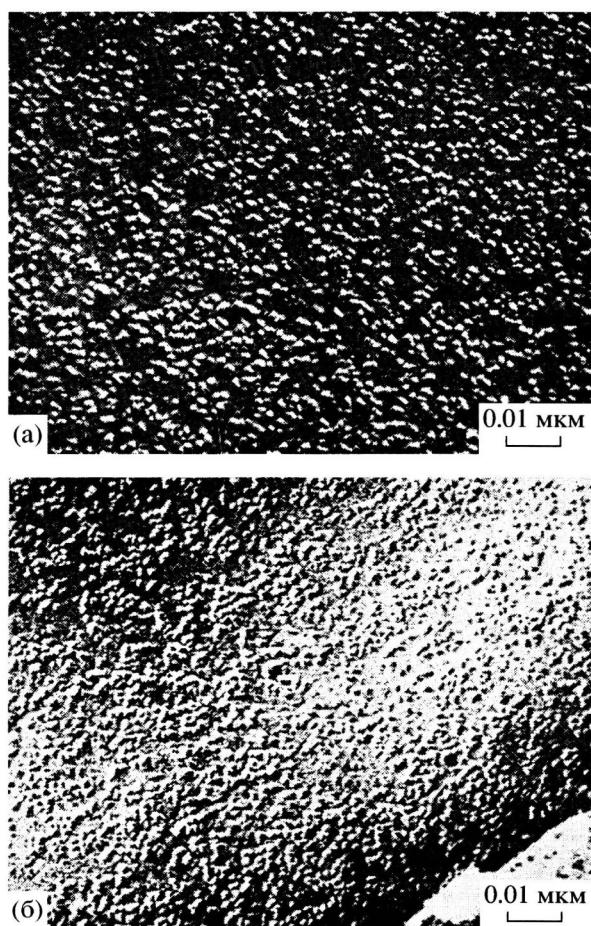
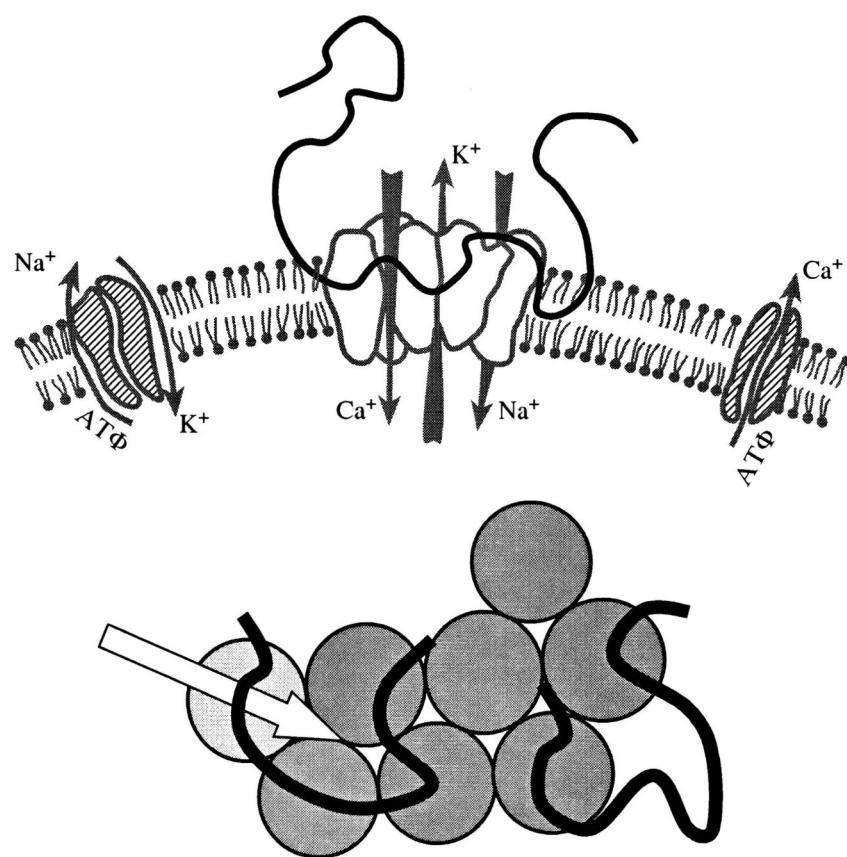


Рис. 5. Микрофотографии продольных сколов мембранны В-лимфоцитов *in vitro*: а – необработанный образец, б – образец, обработанный полиелектролитом.

СПЭ в клеточной мембране образуются поры, сквозь которые ионы начинают диффундировать в направлении градиента концентрации. Электронные микрофотографии продольных сколов мембранны показывают, что обработка индивидуальных клеток СПЭ приводит к агрегации мембранных белков (рис. 5) [8, 9].

Явление агрегации белковых глобул, связывающихся с линейными полиэлектролитами в водных растворах, к тому времени уже было известно и хорошо изучено [12–14]. Центрами связывания в первую очередь служат ионные группы на поверхности глобул, заряд которых противоположен заряду СПЭ. Кроме того, в зависимости от химической структуры полииона и белка связывание может происходить в результате донорно-

акцепторного или гидрофобного взаимодействия. Такие центры связывания имеются и на экспонированных в водной фазе поверхностях плавающих в липидном бислойе мембранных белков. Поэтому было естественно предположить, что именно они служат центрами сорбции СПЭ на внешней мембране клетки, а мембранные белки, взаимодействуя с полионом, собираются в двухмерные кластеры по механизму, сходному с тем, который реализуется в водных растворах. Тогда в роли пор, по всей вероятности, выступают промежутки между агрегированными белковыми глобулами наподобие тех, что остаются между плотно упакованными на плоскости биллярдными шарами. Ниже представлена предполагаемая схема.



Известно, что энергию, необходимую для поддержания жизнедеятельности, любая клетка получает из одного универсального источника: реакции окисления аденинтрифосфата (АТФ). В частности, естественный ионный баланс в клетке поддерживают мембранные ферменты: (K^+ , Na^+

и Ca^{2+} АТФазы. Эти молекулярные насосы способны транспортировать ионы сквозь мембрану против градиента их концентрации. Для выполнения такой работы они расходуют энергию, запасенную в АТФ. Парциальное потребление АТФ каждой из АТФаз можно оценить путем добавле-

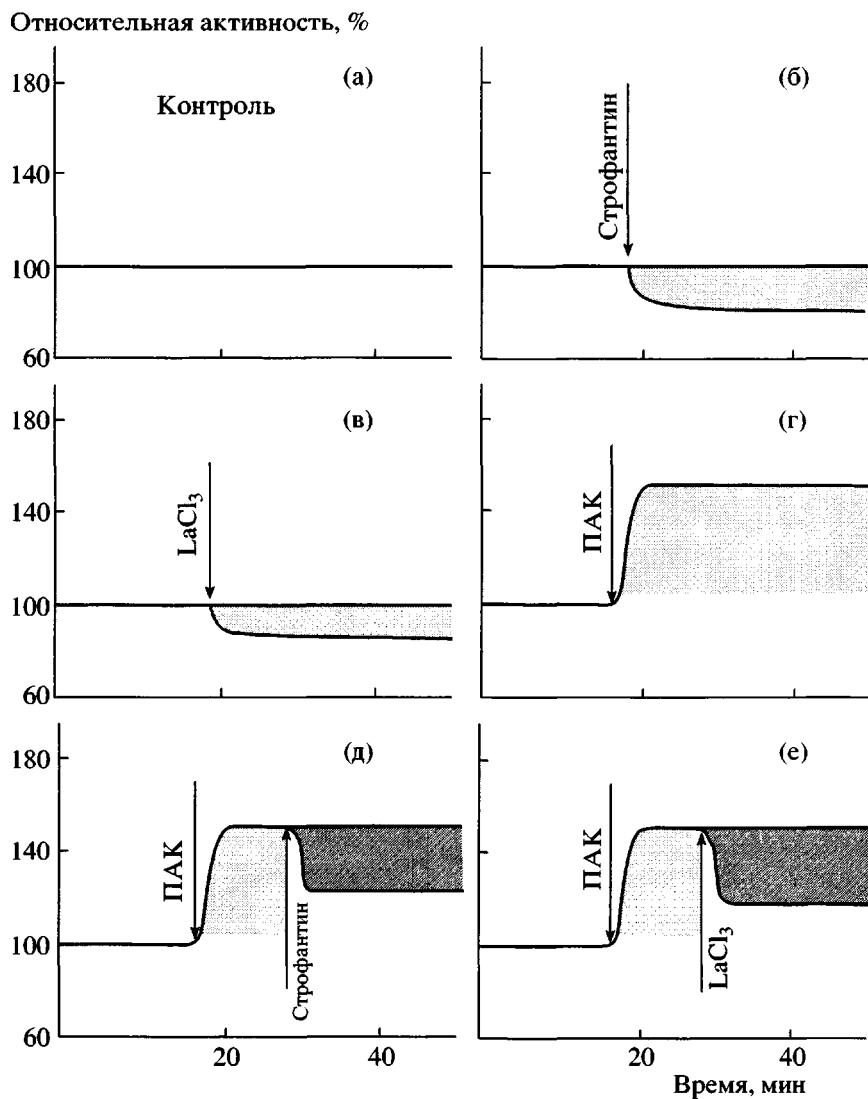


Рис. 6. Влияние ПАК на относительную активность K^+ , Na^+ и Ca^{2+} -АТФаз. Пояснения в тексте.

ния в культуру клеток избирательно действующих ингибиторов.

Из данных рис. 6 (а, б и в) следует, что общее относительное потребление АТФ В-лимфоцитами действительно снижается при добавлении оуабанина (строфантина) и соли лантана – специфических ингибиторов соответственно (K^+ , Na^+) и Ca^{2+} -АТФаз. Из данных, приведенных в нижней части рис. 6г, следует, что введение ПАК в водную суспензию В-лимфоцитов вызывает резкое увеличение относительного потребления клетками АТФ, а ингибиторный анализ (рис. 6д, е) показывает, что это увеличение и в самом деле обусловлено дополнительной активацией АТФаз [15, 16]. Нарушение естественного состояния клетки из-за вытекания ионов калия и притока дополнитель-

ного количества ионов кальция приводит к компенсаторному включению молекулярных насосов, а это в свою очередь служит сигналом к запуску и других внутриклеточных систем. Иными словами, клетка начинает делать то, что ей свойственно. В частности, В-лимфоциты начинают делиться и дифференцируются, синтезируя рецепторы для узнавания присутствующих антигенов и тем самым готовясь производить комплементарные им антитела. Характерно, что циклазные ферменты – непременные участники реакции иммунных клеток при обычном механизме запуска иммунной системы, в данном случае практически не активируются.

Приведенные экспериментальные факты позволили нам сделать еще одно важное заключе-

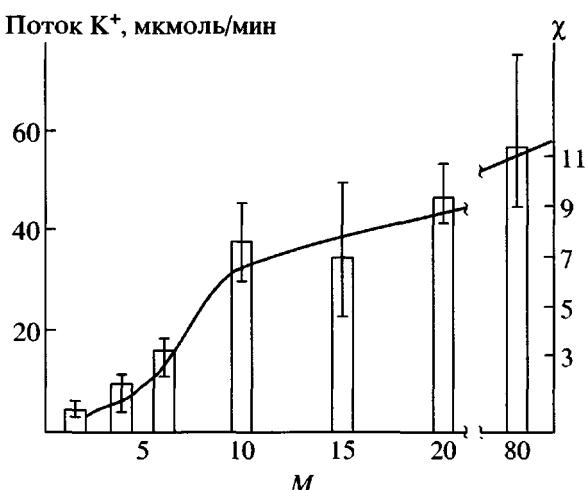


Рис. 7. Зависимость потока ионов K^+ сквозь мембранные В-лимфоцитов *in vitro* и усиления иммунного ответа *in vivo* от молекулярной массы ПАК. χ – максимальный коэффициент стимуляции.

ние: при контакте с иммунной клеткой СПЭ выполняет функцию незнакомого ей триггерного фактора. Он действует по альтернативному механизму в обход некоторых предусмотренных природой ключевых событий, в частности упомянутого выше двойного узнавания. В самом деле, в описанных выше системах *in vitro* Т_h-лимфоциты (непременные участники процесса двойного узнавания) просто отсутствовали. Это заключение полностью согласуется с результатами, полученными при использовании “живых пробирок” – экспериментальных мышей, искусственно лишенных Т-клеток путем хирургического удаления тимуса и γ-облучения костного мозга. Вместе с тем В-лимфоциты, созревающие и дифференцирующиеся в селезенке, у таких мышей остаются (поэтому иммунологи называют их В-мышами). Не имея Т-клеток, В-мыши не способны дать обычную иммунную реакцию на введенные антигены. Однако при введении тех же антигенов в смеси с СПЭ у них вырабатывается практически столь же сильный иммунный ответ, как и у нормальных мышей.

Следовательно, СПЭ, стимулируя развитие иммунной реакции, используют для ее запуска альтернативный механизм не только *in vitro*, но и *in vivo*. Впрочем, о том же свидетельствуют и данные рис. 7, демонстрирующего поразительный параллелизм зависимостей интенсивности трансмембранных ионного потока *in vitro* и коэффи-

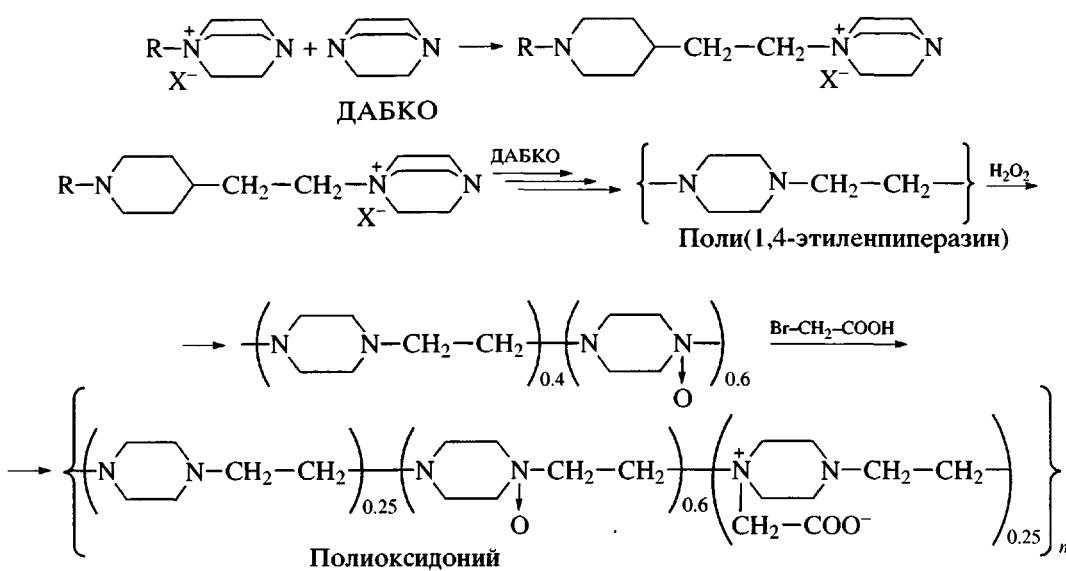
циента усиления иммунного ответа *in vivo* от степени полимеризации СПЭ.

ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЙ ИММУНОСТИМУЛЯТОР ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА

Возможность практического использования СПЭ в качестве иммуностимуляторов представлялась весьма заманчивой прежде всего именно потому, что сами они не иммуногенны. Это значит, что такой СПЭ, усиливая иммунный ответ на попавшие в организм антигены, не заставит иммунную систему попусту растрачивать ресурсы на выработку антител к самому себе. Кроме того, установленный факт запуска иммунной системы без участия Т-клеток-помощников, через посредство которых гены главного комплекса гистосовместимости контролируют силу иммунного ответа, позволял надеяться на возможность фенотипической коррекции действия иммунной системы, т.е. компенсации иммунодефицита у конкретных особей, генетически слабо защищенных от микробов – носителей данного антигена. Главной задачей, естественно, стало создание СПЭ, который можно было бы вводить человеку без вредных побочных последствий. Для синтеза исходных макромолекул была использована ранее открытая и детально изученная полимеризация стерически напряженных бициклических аминов с раскрытием одного из циклов [17–19]. В подходящих условиях эта реакция протекает по механизму “живых” цепей и потому позволяет получать линейные полииамины, характеризующиеся строго заданной степенью полимеризации и очень узким ММР. В качестве исходного мономера по ряду причин (в том числе по технико-экономическим показателям) был выбран 1,4-диамино-бицикло(2,2,2)октан (ДАБКО) (триэтилендиамин). Его полимеризация по механизму “живых” цепей ведет к образованию поли-1,4-этиленпiperазина с выходом, близким к 100%. Из этого полимера путем окисления части его звеньев пероксидом водорода до N-оксида и последующей квaternизации бромуксусной кислотой был синтезирован нетоксичный поликатионный иммуностимулятор [20, 21], который прошел все необходимые испытания и был разрешен в России для медицинского применения. Сегодня его можно купить в аптеках под фирменным названием “Полиоксидоний”. Решение этой задачи – результат многолетнего совместного труда химиков и

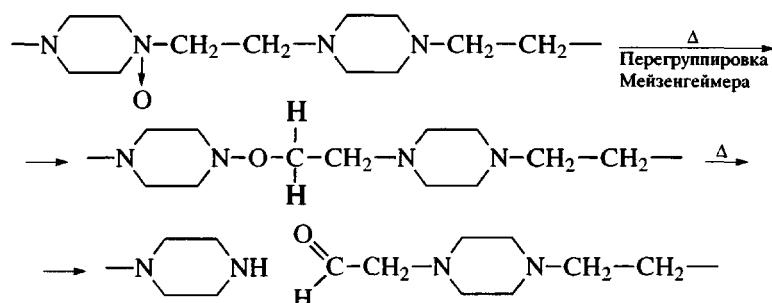
иммунологов, вовлеченных в проект. Ниже приведена схема синтеза и структурная формула по-

лиоксидония, который представляет собой водорастворимый тройной сополимер.



Ключевую роль в драматическом снижении острой токсичности, обычно свойственной полиаминам, здесь играют N-оксидные группы, в первую очередь потому, что они “разбавляют” звенья полимерной цепи, содержащие аминогруппы. Тем самым до безопасного для организма уровня снижается линейная плотность положительных зарядов, которые возникают в результате протонирования свободных аминогрупп. При этом, однако, сополимер не теряет растворимости в воде, поскольку электронейтральные N-оксидные группы представляют собой гидрофильные диполи. Известно, что в отличие от полиаминов полин-оксиды вообще нетоксичны. Но будучи инертными в отношении мембранных белков, они, понятно, не могут служить триггерами для запуска

иммунной системы. При разработке полиоксидония опытным путем было найдено оптимальное соотношение амино-групп и N-оксидных групп, при котором токсичность сополимера уже снижена до вполне приемлемого уровня, но его способность взаимодействовать с мембраной и активировать иммунные клетки еще не утрачена. Кроме того, N-оксидные звенья, включенные в основную цепь полиоксидония, при умеренных температурах перегруппировываются в оксимы (перегруппировка Мейзенгеймера), которые затем распадаются по связи N-C с образованием амино- и альдегидной групп. В результате цепи полиоксидония расщепляются на относительно короткие фрагменты [22]:



В условиях организма эти реакции протекают достаточно медленно, так что введенный иммуно-

стимулятор вполне успевает выполнить свою функцию. Показано, что для практически полного

удаления его из организма требуется около двух недель, а для активации иммунной системы – не более 2 ч. В дальнейшем иммунная реакция развивается уже без участия СПЭ. Карбоксильные группы в структуре полиоксидония служат для его дополнительной химической модификации.

Молекулярный механизм активации клеток при действии СПЭ, установленный на примере изолированных В-лимфоцитов в опытах *in vitro*, не специчен. Точно так же СПЭ могут взаимодействовать и с другими мембранами. Поэтому введенный в организм полиоксидоний способен стимулировать целый спектр иммунокомпетентных клеток, выполняющих разные функции и обеспечивающих различные проявления иммунной защиты. Соответственно широк и спектр его применений, уже сегодня реализуемых в медицинской практике. Они относятся к области как иммунотерапии (хирургические инфекции, гноино-воспалительные процессы кожи и мягких тканей, хронические неспецифические заболевания бронхо-легочного тракта, туберкулез, аутоиммунные заболевания), так и иммунореабилитации (восстановление иммунитета после перенесенного инфекционного заболевания, профилактика респираторных инфекций, профилактика и восстановление иммунитета после радио- и химиотерапии). Таким образом, насколько нам известно, “Полиоксидоний” стал первым в мире и пока единственным синтетическим полимером, обладающим собственной биологической активностью, который разрешен и уже несколько лет успешно применяется в медицине в качестве препарата для внутреннего введения.

Из сказанного выше следует, однако, что действие “Полиоксидония” как иммуностимулятора неспецифическим образом рассредоточено по многим компонентам иммунной системы. Для иммуностимулятора эта широта – безусловный плюс. Но такой стимуляции недостаточно, чтобы вызвать в организме целенаправленно сильный иммунный ответ на конкретный антиген или конкретную группу антигенов в обход ИР-генного контроля.

МОЛЕКУЛЯРНОЕ УЗНАВАНИЕ

Для достижения целенаправленно сильного иммунного ответа по меньшей мере необходимо сфокусировать действие СПЭ, обеспечив его “ад-

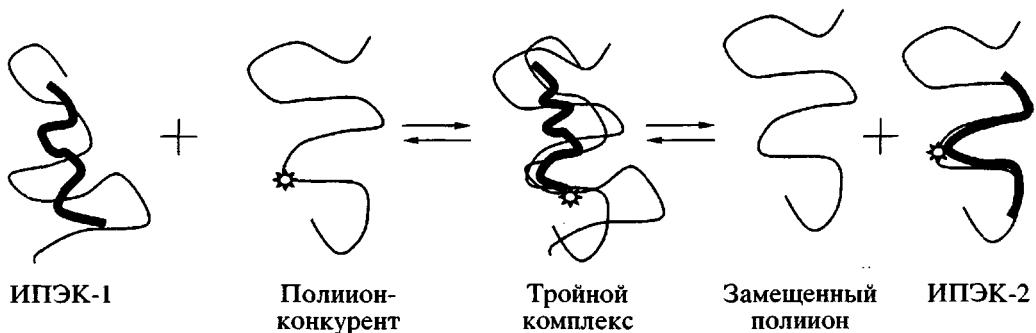
ресную” доставку и избирательную сорбцию на поверхности соответствующих В-лимфоцитов. В качестве “адреса” не трудно химически привязать к полимерной цепи нужный (по терминологии молекулярных биологов) “вектор”: антиген или антигенную детерминанту. Тогда, если полученный конъюгат, блуждая между различными клетками в организме, случайно достигнет той, на поверхности которой имеются комплементарные данному антигену рецепторы, его детерминанта получит возможность связаться с рецептором. Образование такой связи, фиксирующей СПЭ на поверхности мембраны, будет означать, что конъюгат “узнал” клетку, которой он был адресован.

Не очевидной представлялась сама возможность свободного блуждания введенного в организм конъюгата антиген–СПЭ в поисках клетки-адресата. Дело в том, что узнавание на молекулярном уровне всегда происходит методом проб и ошибок. Следовательно, конъюгату, прежде чем найти нужную клетку, предстоит в ходе теплового движения вступить во множество временных пробных контактов с огромным числом других клеток, не наделенных адекватными рецепторами. Способен ли он это сделать в условиях организма? Известно, что длинноцепочечные полимеры обычно необратимо сорбируются на поверхностях и из-за кооперативности взаимодействия не покидают поверхность сорбента даже при очень большом (в пределе бесконечном) разбавлении раствора. Клеточная мембрана – хороший сорбент для всех полиэлектролитов, запускающих иммунный ответ, особенно для поликатионов. Поэтому возникало естественное опасение, что конъюгаты, адресованные определенному клону В-лимфоцитов, сразу прилипнут к другим клеткам, имеющимся в огромном избытке, и не смогут достичь адресата.

Вместе с тем при постановке этой проблемы мы уже располагали косвенными данными, которые позволяли надеяться, что механизм поиска конъюгатом нужных клеток методом проб и ошибок на самом деле все же существует, несмотря на упомянутые ограничения. Эти данные были получены при изучении поведения комплексов, которые образуются из двух противоположно заряженных полиэлектролитов в водных растворах. Поликатион и поланион в таком интерполиэлектролитном комплексе (**ИПЭК**) со-

единяются друг с другом множеством солевых связей, которые могут диссоциировать только кооперативным образом. Поэтому в определенных интервалах pH и ионной силы ИПЭК абсолютно устойчивы и не расщепляются на исходные компоненты при разбавлении. Тем не менее, к числу фундаментальных свойств ИПЭК относится их способность вступать в конкурентные реакции обмена и замещения с другими полиэлектролитами [23, 24]. Такие реакции не требуют

предварительной диссоциации ИПЭК на исходные компоненты. Они протекают путем образования промежуточных тройных комплексов, как это показано на приведенной ниже схеме, где полион, изображенный полужирной линией, и полионы, изображенные тонкими линиями, несут противоположные заряды, а присутствующие в системе низкомолекулярные противоионы для простоты не обозначены.



На самом деле для превращения ИПЭК-2 в ИПЭК-1, т.е. переноса “толстого” полииона с одного “тонкого” партнера на другой, вовсе не требуется, чтобы ИПЭК-1 предварительно диссоциировал на исходные компоненты. В пределах тройного комплекса такой перенос с определенной вероятностью происходит путем флюктуационной перегруппировки ионных пар, связывающих противоположно заряженные полионы. При этом энергия, расходуемая на разрыв одной ионной связи, сразу возвращается в результате образования новой, ей эквивалентной. Более того, если звездочка, которой помечен один из “тонких” полионов, обозначает функциональную группу, способную дополнительно стабилизировать ИПЭК, то “толстый” полион фиксируется в составе ИПЭК-2. После многочисленных проб и ошибок это происходит даже, если непомеченные “тонкие” полионы присутствуют в системе в большом избытке. Иными словами, “толстый” и помеченный “тонкий” полионы находят и узнают друг друга. Замечательно, что для этого не требуется большого числа стабилизирующих групп, а достаточное для узнавания дополнительное средство в расчете на одну звездочку обеспечивается энергией связи, лишь в несколько раз превышающей энергию теплового движения. Так, например, поли(N-этил-4-винилпиридиневые) катионы (ПЭП) в водном растворе методом

проб и ошибок точно узнают среди полиметакрилат анионов те, что помечены одной пиренильной группой в расчете на 1000–1500 мономерных звеньев [25]. В данном случае дополнительное средство привносится гидрофобным взаимодействием пиренильной группы с углеводородными фрагментами цепи ПЭП.

Однако было далеко не очевидно, что механизм молекулярного узнавания, подобный экспериментально установленному для противоположно заряженных полимерных цепей, может действовать также и в системах типа полион-клетка, где каждая клетка-партнер гораздо массивнее полиэлектролитной цепи, а линейные размеры клетки намного превышают контурную длину взаимодействующего с ней полииона. Для устранения сомнений требовались более адекватные модельные системы.

В качестве грубой модели отдельной клетки мы использовали относительно крупные частицы полистирольного латекса (5 мкм в диаметре). Поверхность каждой частицы была покрыта химически связанными с ней сульфогруппами и потому отрицательно заряжена, подобно внешним мембранам большинства клеток. Понятно, что такая частица – сильный сорбент для поликатионов.

Первая задача заключалась в том, чтобы выяснить, могут ли поликатионы, необратимо ад-

сорбированные на отрицательно заряженной поверхности, свободно мигрировать в адсорбционном слое. Для этого упомянутый выше латекс смешивали с водным раствором поли-*L*-лизина, модифицированного небольшим количеством флюоресценциотиоцианильных (**ФИТЦ**) групп. В результате флуоресцентно меченные поликатионы адсорбировались на поверхности латексных частиц. Затем выбирали одну такую частицу, в водной среде освещали ее светом с длиной волны в области поглощения ФИТЦ-групп и с помощью оптического микроскопа наблюдали характерную для них зеленую флуоресценцию. В исходном состоянии зеленый свет равномерно излучала вся поверхность частицы, что свидетельствовало о равномерном распределении флуоресцентных меток в адсорбционном слое. Убедившись в этом, на центр флуоресцирующей поверхности направляли мощный лазерный пучок, толщина которого (2.5 мкм) была несколько меньше диаметра частицы. В зоне воздействия пучка происходила частичная фотодеструкция ФИТЦ-групп. Соответственно на поверхности появлялось пятно с несколько ослабленной флуоресценцией.

Ответ на вопрос был получен путем наблюдения и измерения во времени интенсивности флуоресценции после прекращения действия лазерного пучка. Оказалось, что свечение пятна постепенно восстанавливалось. Через 15–20 мин вся поверхность частицы вновь начинала равномерно излучать. Этот результат однозначно доказывал, что поликатионы, адсорбированные на контактирующей с водой протяженной отрицательно заряженной поверхности, могут достаточно быстро перемещаться в адсорбционном слое, обмениваясь местами друг с другом. Именно таким образом часть “отбеленных” полимерных цепей покидает облученную лазером область. На смену им с не подвергавшейся лазерному воздействию периферии приходят другие свободно блуждающие поликатионы вместе с сохранившимися в их составе флуоресцентными группами. По скорости восстановления флуоресценции была оценена величина коэффициента двухмерной самодиффузии поли-*L*-лизина в адсорбционном слое $D = (2\text{--}6) \times 10^{-8}$ см²/с [26].

Грубой моделью совокупности клеток нам служил монодисперсный ПС-латекс с диаметром частиц около 0.5 мкм. В данном случае их поверхность была покрыта химически привязанными к

ней карбоксильными группами (в среднем 1 группа на 25 Å²) и потому также отрицательно заряжена в нейтральной и щелочной средах [27, 28]. Эту модель мы выбрали, чтобы выяснить, могут ли адсорбированные поликатионы переходить с поверхности одной крупной отрицательно заряженной частицы на другую [27, 29]. В качестве поликатиона был использован ПЭП со степенью полимеризации около 10³. К разбавленному латексу добавляли водный раствор ПЭП, варьируя соотношение положительно заряженных пиридиневых звеньев, приходящихся на один отрицательный заряд поверхности. Для каждого зарядового отношения в одной серии опытов измеряли электрофоретическую подвижность латексных частиц, характеризующую величину и знак их заряда, а в другой параллельной – количество ПЭП, остающегося в растворе после осаждения латекса с помощью препартивной центрифуги. Полученные данные приведены на рис. 8. Видно, что по мере увеличения содержания ПЭП исходный отрицательный заряд частиц уменьшается, а затем при избытке ПЭП происходит их перезарядка: значения электрофоретической подвижности становятся положительными (рис. 8а). Очевидно, что избыточный положительный заряд несет экспонированные в раствор петли и хвосты адсорбированных поликатионов. Существенно, что размер получившихся положительно заряженных частиц не отличался от размера исходных. Важно отметить также, что ход зависимости электрофоретической подвижности от зарядового отношения не менялся при варьировании исходной частичной концентрации латекса в пределах, превышающих 2 десятичных порядка.

Последнее означает, что в области изученных зарядовых отношений все добавленные поликатионы прочно адсорбируются на поверхности латекса и не десорбируются при разбавлении системы. О необратимом характере адсорбции свидетельствуют также данные рис. 8б, который характеризует влияние исходного зарядового отношения на оптическую плотность надосадочной жидкости, измеренную после осаждения латекса. Видно, что в области поглощения ПЭП оптическая плотность остается равной нулю вплоть до насыщения поверхности частиц адсорбирующими на них поликатионами. Как и следовало ожидать, содержание ПЭП в надосадочной жид-

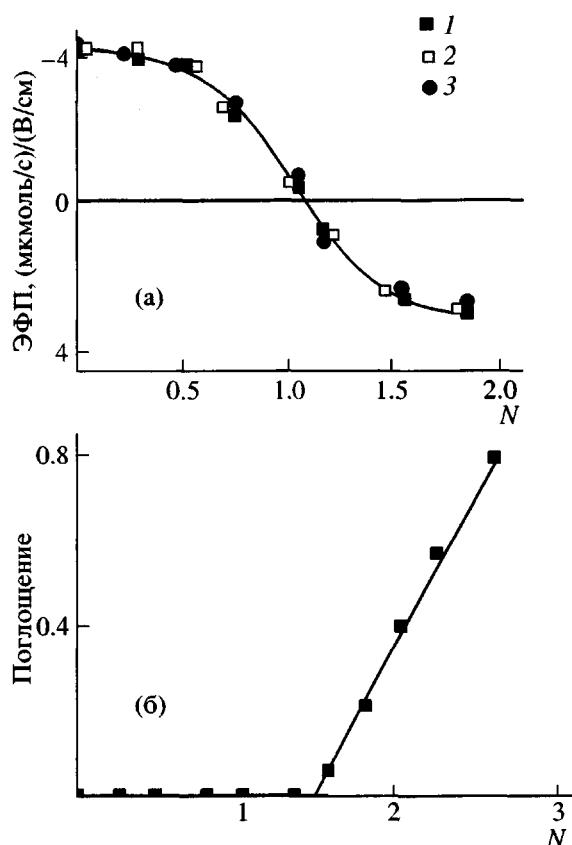


Рис. 8. Зависимость электрофоретической подвижности (ЭФП) латексных частиц (а) и поглощения ПЭП в надосадочной жидкости (б) от соотношения числа звеньев N ПЭП к числу карбоксильных групп на поверхности латексных частиц. Концентрация латекса 9×10^9 (1), 1.8×10^{11} (2) и 1.8×10^{12} частиц/л (3).

кости начинает линейно расти только после того, как достигнуто насыщение.

Тем не менее, две следующих серии опытов однозначно показали, что, несмотря на необратимость адсорбции, эффективный механизм миграции поликатионов с поверхности одной отрицательно заряженной частицы на другую на самом деле все же существует. Чтобы получить ответ на вопрос, мы просто смешали суспензию исходных отрицательно заряженных частиц с суспензией тех, что приобрели положительный заряд благодаря адсорбции поликатионов. На рис. 9 представлены результаты измерений электрофоретической подвижности и размера частиц, проведенные параллельно через различные промежутки времени после смешения. Данные, полученные через 5 мин, свидетельствовали о кардинальных переменах, произошедших за это время в реакци-

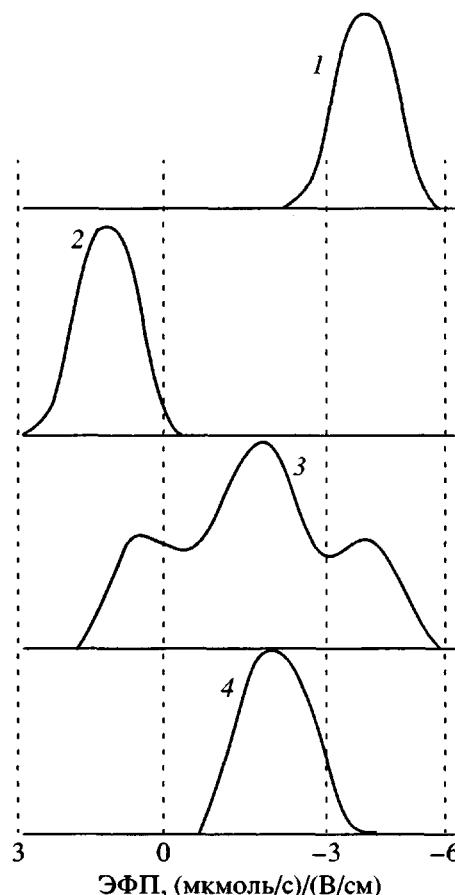


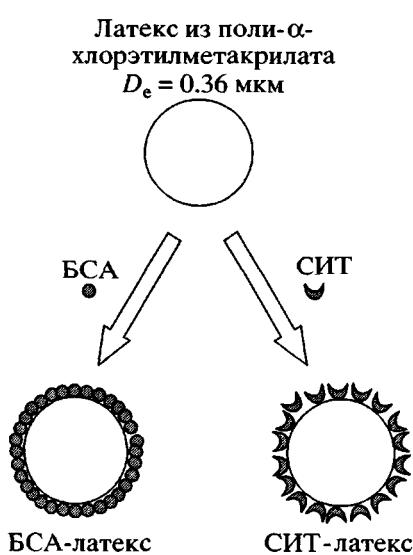
Рис. 9. Экспериментальное доказательство миграции адсорбированного ПЭП между частицами латекса. Электрофоретическая подвижность латексных частиц: 1 – исходных, 2 – перезаряженных адсорбированным ПЭП, 3 и 4 – после смешения 1 и 2, через 5 и через 40 мин соответственно.

онной системе. Наряду с частицами, характеризующимися значениями электрофоретической подвижности, близкими к исходным, появились другие, электрофоретическая подвижность которых имела промежуточное значение. В то же время по меньшей мере на порядок увеличился средний размер, свидетельствуя об агрегации исходных частиц. Однако эти перемены, как оказалось, были временными и относились к промежуточному состоянию системы. Измерения, проведенные через 40 мин, показали, что диаметр частиц вернулся к исходной величине и главное, что величина электрофоретической подвижности теперь уже у всех частиц приняла промежуточное значение. Проведенный эксперимент однозначно доказал, что поликатионы могут мигрировать не только в адсорбционном слое каждой отдельной частицы, но и переходить с поверхности одной частицы на

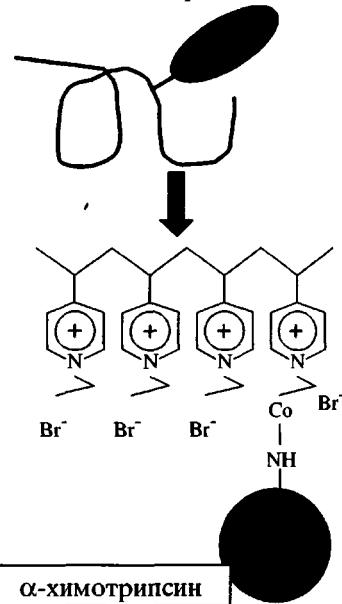
поверхность другой. Стал ясен и механизм, по которому все это происходит. Сразу после смешения исходные отрицательно заряженные латексные частицы, встретившись с заряженными положительно, связываются друг с другом за счет электростатического притяжения и образуют агрегаты. Понятно, что минимум свободной энергии системы соответствует равномерному распределению поликатионов между частицами внутри агрегата. Как следует из приведенных данных, в такое состояние система приходит за весьма умеренные времена, что собственно и доказывает возможность поликатионов не только диффундировать по поверхности отдельной латексной частицы, но и "переползать" с одной частицы на другую в местах их временно установленных контактов. При равномерном распределении поликатионов внутри агрегата выравнивается и заряд латексных частиц, а следовательно, утрачивается их взаимное электростатическое притяжение.

Тогда под действием теплового движения агрегаты диспергируются до частиц исходного размера.

Таким образом, было показано, что поликатиону на самом деле кинетически не запрещено методом проб и ошибок искать среди множества отрицательно заряженных частиц одну, которой он может быть адресован. "Адресом" должна служить прикрепленная к поликатиону молекула, способная узнать структурно комплементарный ей реагент, прикрепленный к поверхности частицы-адресата. В качестве таких партнеров мы выбрали фермент α -химотрипсин (ХТ) и другой белок – соевый ингибитор трипсина (СИТ) [29, 30]. Последний, связываясь с ХТ, полностью угнетает его катализическую активность. Элементы системы, использованной для моделирования процесса узнавания клетки конъюгатом поликатион-антитела, изображены на следующей схеме:



Конъюгат α -химотрипсина и ПЭП



Моделями клеток служили две разновидности модифицированных частиц латекса (0.36 мкм в диаметре) из поли- α -хлоракрилата. К поверхности одних пришивали ковалентными связями СИТ, к поверхности других – бычий сывороточный альбумин (БСА). Эти белки имеют близкие молекулярные массы. Их изоэлектрические точки расположены в кислой области рН. Поэтому в нейтральной среде оба они заряжены отрица-

тельно и, следовательно, могут служить центрами сильного электростатического связывания поликатионов с поверхностью латексных частиц. Для изготовления модели конъюгата поликатион-антитела к ПЭП в качестве вектора химически присоединили ХТ в расчете 1 молекулы белка на полимерную цепь длиной около 1000 мономерных звеньев. Таким образом, потенциальными мишениями для конъюгата должны были служить

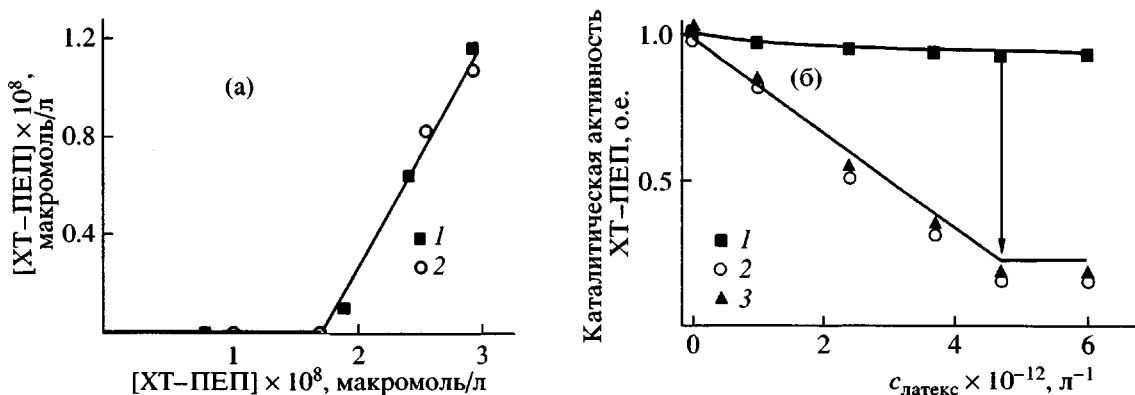
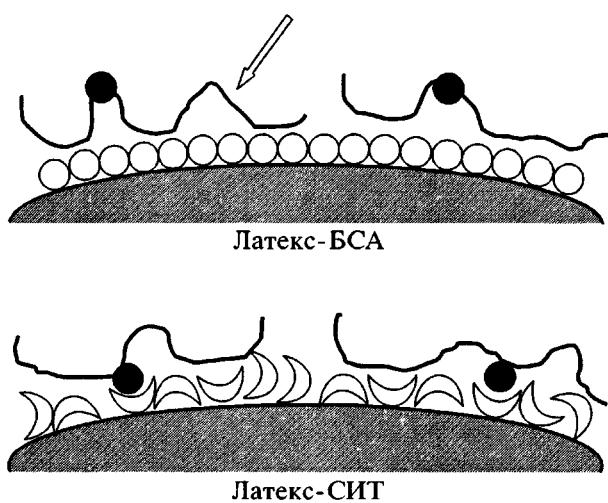


Рис. 10. Взаимодействие ХТ-ПЭП конъюгата с латексами, покрытыми БСА (Л-БСА) и СИТ (Л-СИТ): а – зависимость остаточной концентрации конъюгата в надосадочной жидкости от количества добавленного конъюгата. Л-БСА (1) и Л-СИТ (2); б – изменение катализической активности ХТ-ПЭП конъюгата при взаимодействии с Л-БСА (1), Л-СИТ (2) и их смесью (3).

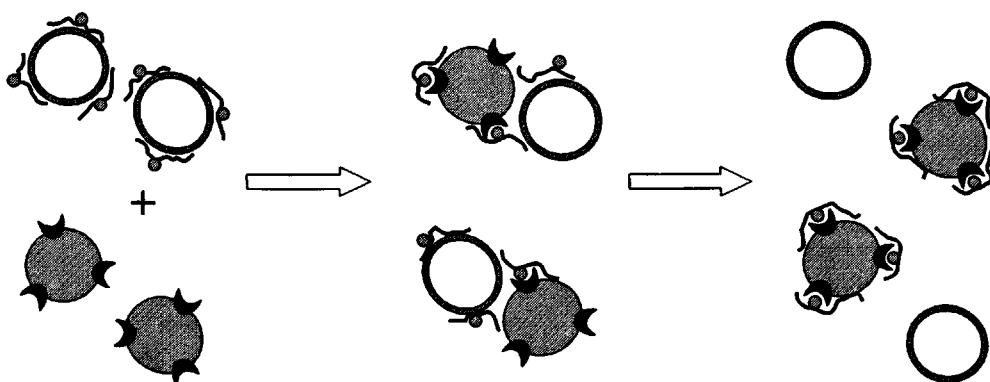
частицы латекса, покрытые СИТ (СИТ-латекс), а их конкурентами – частицы латекса, покрытые БСА (БСА-латекс). Достоинство выбранной модельной системы состояло в простоте констатации самого факта адресной доставки и фиксации конъюгатов на поверхности “клеток-мишеней”, т.е. мониторинга процесса связывания ХТ-вектора с СИТ-рецептором. Для этого достаточно добавить в исследуемую систему какой-либо субстрат ХТ и следить за скоростью соответствующей ферментативной реакции. В качестве такого субстрата мы использовали нитрофенилацетат, скорость гидролиза которого легко измерить спектрофотометрически по образованию нитрофенола. Главные результаты экспериментов с описанной выше модельной системой приведены на рис. 10. Как и следовало ожидать, при раздельном смешении растворенный в воде конъюгат ХТ-ПЭП количественно адсорбировался на каждом из двух

латексов вплоть до полного насыщения конъюгатом поверхности латексных частиц (рис. 10а). В обоих случаях картина адсорбции совпадала с той, что мы наблюдали при взаимодействии ПЭП с частицами латекса, покрытыми карбоксильными группами (рис. 8б). Вместе с тем из рис. 10б следует, что частицы БСА-латекса практически не влияли на ферментативную активность конъюгата ХТ-ПЭП, адсорбированного на их поверхности, тогда как его адсорбция на поверхности частиц СИТ-латекса сопровождалась линейным падением скорости ферментативной реакции и в конечном счете почти полным ингибицированием фермента. Из этого следует, что при адсорбции конъюгата ХТ-ПЭП молекулы ферmenta вступали в дополнительное взаимодействие с комплементарными им молекулами СИТ. Предполагаемое различие в структуре адсорбционных слоев иллюстрируют следующая схема:



Ключевой вопрос, однако, состоял в том, может ли конъюгат ХТ-ПЭП различить частицы СИТ-латекса на фоне частиц БСА-латекса, поскольку последние также способны прочно адсорбировать ПЭП. Из данных, приведенных на рис. 10б, следует, что может. Видно, что СИТ-латекс, добавленный к предварительно приготовленной смеси конъюгата ХТ-ПЭП с БСА-латексом, ингибировал изначально адсорбированный на БСА-латексе конъюгат столь же эффективно, как и в отсутствие латекса-конкурента. Измерение катализической активности в тройной смеси каждый раз проводили через 5 мин после добавления СИТ-латекса. Иными словами, конъюгат количественно переходил с латексных частиц, покрытых БСА, на латексные частицы, покрытые СИТ, за время, не превышавшее 5 мин. Очевидно, что, как и в описанном выше случае взаимодействия ПЭП с карбоксилированным

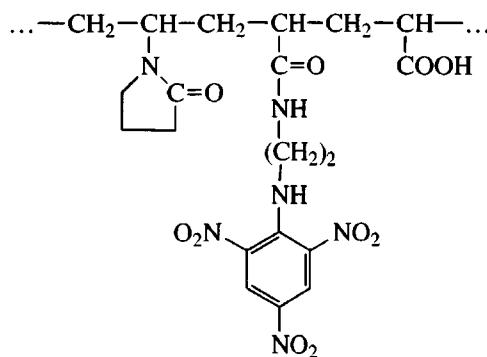
латексом, адсорбция конъюгата ХТ-ПЭП на частицах БСА-латекса необратима лишь применительно к освобождению адсорбированного конъюгата и его возвращению в исходный раствор. Однако, если между латексными частицами возникает контакт, то по месту контакта конъюгат может переходить с поверхности одной латексной частицы на другую. Таким образом, методом проб и ошибок конъюгат ХТ-ПЭП добирается до частицы СИТ-латекса. Там связанная с поликатионом молекула ХТ находит комплементарную молекулу СИТ и, образуя с ней комплекс, подобно якорю фиксирует на поверхности этой частицы весь конъюгат [30]. Процесс специфического узнавания конъюгатом частиц-мишеней среди других частиц, на которых он адсорбируется, но неспецифическим образом, можно представить следующей схемой:



Описанные выше достаточно простые модели послужили физико-химическим обоснованием неожиданных явлений, которые иммунологи обнаружили при введении в организм конъюгированных с СПЭ антигенов.

ПОЛИМЕР-СУБЬЕДИНИЧНЫЕ ИММУНОГЕНЫ

Простейшим примером стал сополимер акриловой кислоты (АК) с N-винилпирролидоном (ВП), к которому ковалентными связями были пришиты тринитрофенилные (ТНФ) группы [8, 9, 31]:



Сами по себе низкомолекулярные ТНФ соединения не иммуногенны. Однако еще на заре развития иммунологии было показано, что конъюгаты ТНФ с белковыми антигенами при введении в

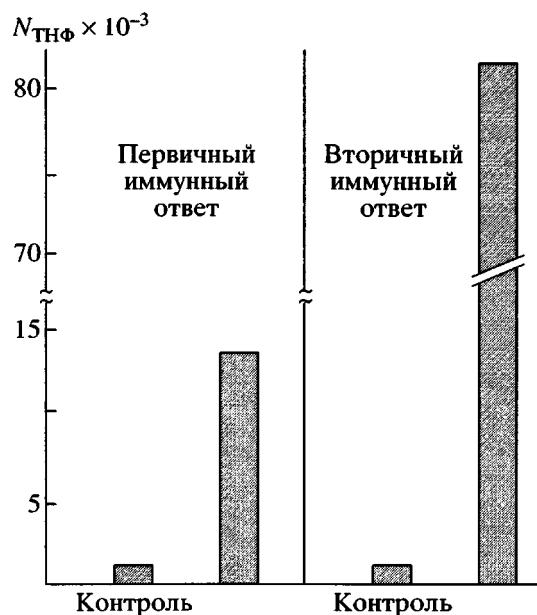


Рис. 11. Иммунный ответ у мышей на введение конъюгата ТНФ, конъюгированного с сополимером АК-ВП. N_{TNF} – количество ТНФ-специфических АОК на селезенку.

организм вызывают иммунную реакцию, при которой специфические к ТНФ антитела образуются наряду с антителами к другим антигенным детерминантам белковой молекулы. Данные, приведенные на рис. 11, показывают, что конъюгат ТНФ (АК-ВП) уже при первичном введении вызывает образование весьма значительного числа ТНФ-специфических антителобразующих клеток (АОК) в селезенке животных. Число этих клеток, как и титр самих антител, служит мерой эффективности иммунного ответа организма на введенный антиген. Повторное введение конъюгата сопровождалось колossalным усилением иммунной реакции. При этом иммунная система

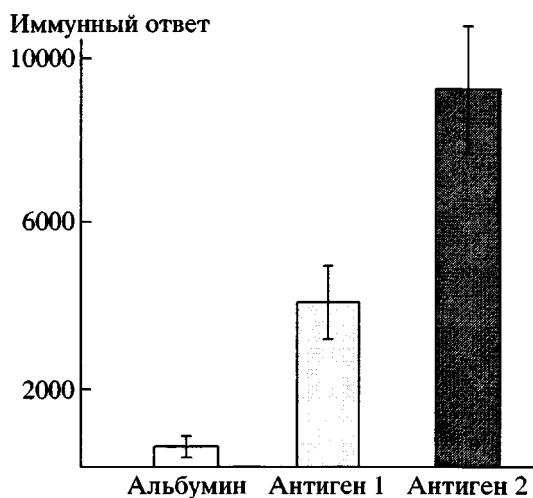


Рис. 12. Иммунный ответ (АОК) у мышей на введение БСА, его комплекса (антиген 1) и конъюгата (антиген 2) с ПЭП.

не вырабатывала никаких других антител кроме тех, которые комплементарны ТНФ.

На следующем этапе мы присоединили к СПЭ настоящий белковый антиген – БСА. В качестве СПЭ использовали две модификации цепей ПЭП. Одна содержала несколько мольных процентов гидрофобных цетильных, другая – карбоксиметиленовых групп [8, 9, 32, 33]. В глобуле сывороточных альбуминов, как известно, имеется гидрофобный “карман”, способный сорбировать алифатические фрагменты молекул. Благодаря этому глобулы БСА в водном растворе сами прикреплялись к поликатионам, модифицированным гидрофобными группами. В другом варианте их прикрепляли ковалентными связями, конденсируя карбоксильные группы СПЭ с аминогруппами белка.



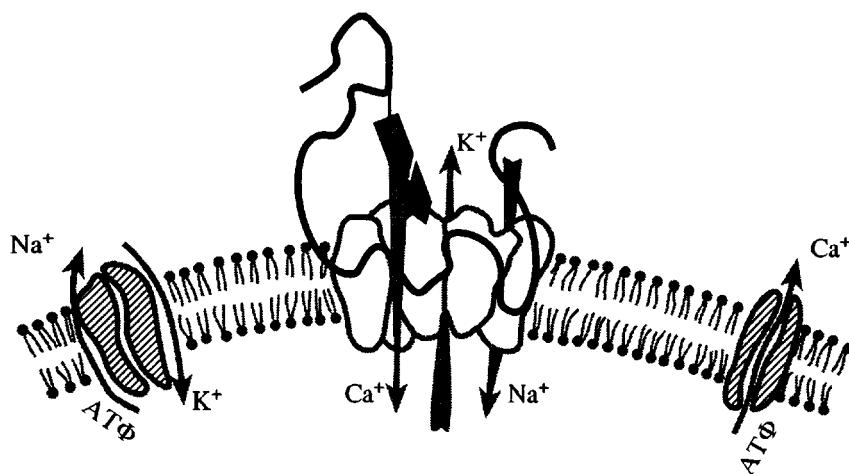
Сам по себе БСА, как и другие сывороточные альбумины, весьма слабый антиген. Однако в

связке с СПЭ он вызывал у мышей гораздо более сильную иммунную реакцию (рис. 12). В случае

ковалентного конъюгата усиление достигало двух десятичных порядков [32, 33]. В этом примере, как и в предыдущем, накапливавшиеся в селезенке АОК были строго специфичны по отношению к БСА. Следовательно, в условиях организма конъюгаты, как и в модельных системах, методом проб и ошибок находили клетки-мишени.

В свете полученных данных можно было полагать, что биохимический механизм запуска

специфической иммунной реакции конъюгатами антиген-СПЭ аналогичен рассмотренному выше для СПЭ-иммуностимуляторов. Однако в отличие от неизбирательно действующих СПЭ-полиэлектролитов действие конъюгатов фокусируется на клетках, несущих рецепторы, которые комплементарны присоединенным к СПЭ антигенам. Ситуация, складывающаяся в последнем случае во внешней мембране клетки-мишени, изображена ниже.



Впрочем, вскоре в опытах на животных – носителях IR-генов различного состава, тому были получены хотя и косвенные, но очень серьезные подтверждения, которые во многом предопределили практическую значимость всей работы в целом [8, 9, 34]. В качестве экспериментальных животных использовали мышей двух генетических

линий. Одна из этих линий "nude" (*nu/nu*) искусственно выведена специально для иммунологических исследований. Мыши "nude" генетически лишены иммунной защиты. Соответственно они не производят антител в ответ на введение им каких-либо антигенов. Мыши другой линии (*nu/+*) заметно реагируют на БСА (как уже упоминалось, относительно слабый антиген) и значительно сильнее на бычий гаммаглобулин (БГГ). Этот известный факт естественно подтвердился и в контрольных опытах (рис. 13). Основываясь на уже полученных данных по усилинию специфического иммунного ответа у беспородных мышей на конъюгаты ТНФ-СПЭ и БСА-СПЭ, можно было ожидать обнаруженную на опыте усиленную реакцию мышей (*nu/+*) на введение как БСА, так и БГГ, конъюгированных с АК-ВП. В свете логических построений, на которые мы уже тогда опирались, нас обрадовал, но не удивил и другой результат, представленный на рис. 13. В селезенке генетически беззащитных мышей "nude" в ответ на введение конъюгатов, вырабатывалось почти столько же АОК, сколько и в генетически защищенных. Таким образом, конъюгаты дейст-

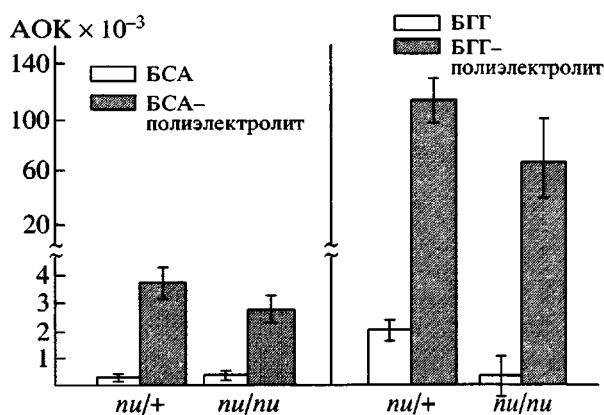


Рис. 13. Независимость силы иммунного ответа от Т-лимфоцитов-помощников. Пояснения в тексте.

вительно запускали иммунную систему по альтернативному механизму, обходя диктат IR-генов, которые при обычном запуске контролируют эффективность иммунной реакции у отдельно взятых особей. Тем самым с помощью полимерсубъединичных иммуногенов удалось осуществить фенотипическую коррекцию иммунного ответа.

Последняя точка в системе доказательств была поставлена опытами с конъюгатом, в котором в качестве антигена был использован особый синтетический полипептид, известный в иммунологии под названием (T,Г)-А-Л-антителен [8, 9]. Он знаменует как раз тем, что благодаря очень высокой иммуногенной специфичности в свое время послужил открытию самого факта существования генов иммунного ответа [35, 36]. (T,Г)-А-Л – это первые буквы в названиях аминокислотных остатков, из которых на самом деле состоит этот полипептид. Он представляет собой гребнеобразный сополимер, основная цепь которого – высокомолекулярный поли-L-лизин, а боковые ветви – пентапептиды. Каждая ветвь содержит по три остатка аланина и по одному остатку глутаминовой кислоты и тирозина, если перечислять в направлении от основной цепи. Для постановки опытов, которые должны были дать однозначный ответ на вопрос, мы приготовили конъюгат, привязав (T,Г)-А-Л-антителен к сополимеру АК-ВП. Этот конъюгат вводили мышам двух генетических линий (СВА и С57BL) и сравнивали его действие с действием свободного (T,Г)-А-Л-антителена. Результаты приведены на рис. 14. У мышей СВА IR-гены с запрограммированным иммунным ответом на (T,Г)-А-Л-последовательность вовсе отсутствуют. Соответственно иммунная система этих мышей не реагирует на свободный (T,Г)-А-Л-антителен. У мышей С57BL с IR-генами к (T,Г)-А-Л все в порядке, поэтому мыши этой линии в ответ на введение свободного (T,Г)-А-Л-антителена вырабатывают достаточно большое число АОК, высоко специфических по отношению к (T,Г)-А-Л. Введение (T,Г)-А-Л-антителена, конъюгированного с сополимером АК-ВП, мышам С57BL, как и в случае других конъюгированных антигенов, приводило к дополнительному многократному увеличению их специфической иммунной реакции. Замечательно, однако, что и мыши СВА, вовсе не реагирующие на свободный полипептид, реагировали на его конъюгат так же сильно, как их генетически

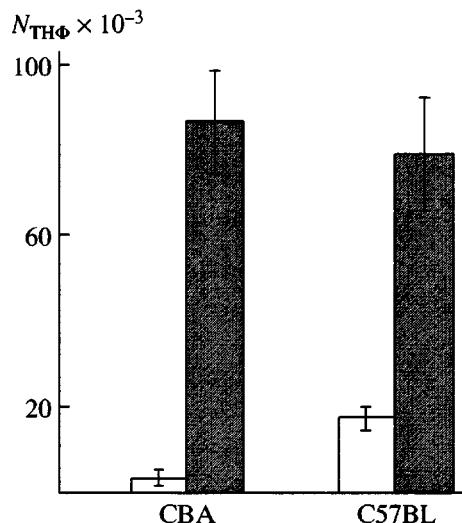


Рис. 14. Фенотипическая коррекция иммунного ответа. Пояснения в тексте.

“благополучные” собратья [8, 9]. Последний факт строго доказывает, что присоединение антигена к СПЭ позволяет получить иммуногены, при иммунизации которыми, действительно, достигается фенотипическая коррекция иммунного ответа.

В самом деле, существование IR-генов было установлено как раз в результате обнаружения резких различий в силе иммунной реакции различных особей на один и тот же антиген, в частности полипептид (T,Г)-А-Л. Эти различия сглаживаются при иммунизации (T,Г)-А-Л-СПЭ-конъюгатом. Поэтому степень достоверности вывода о фенотипической коррекции столь же высока, как и самого факта существования IR-генов. В данном случае коррекция – не что иное, как результат запуска иммунной системы по рассмотренному выше альтернативному механизму в обход предусмотренного природой генетического контроля силы иммунного ответа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОЛИМЕР-СУБЪЕДИНИЧНЫЕ ВАКЦИНЫ

На следующем этапе исследований иммунологам предстояло ответить на критически важный вопрос о том, проявятся ли у антиген-СПЭ конъюгатов протективные свойства, если в качестве антигенов к цепям полиэлектролитных иммуностимуляторов пришить предварительно выделенные и очищенные микробные белки или полисахариды – визитные карточки болезнетворных

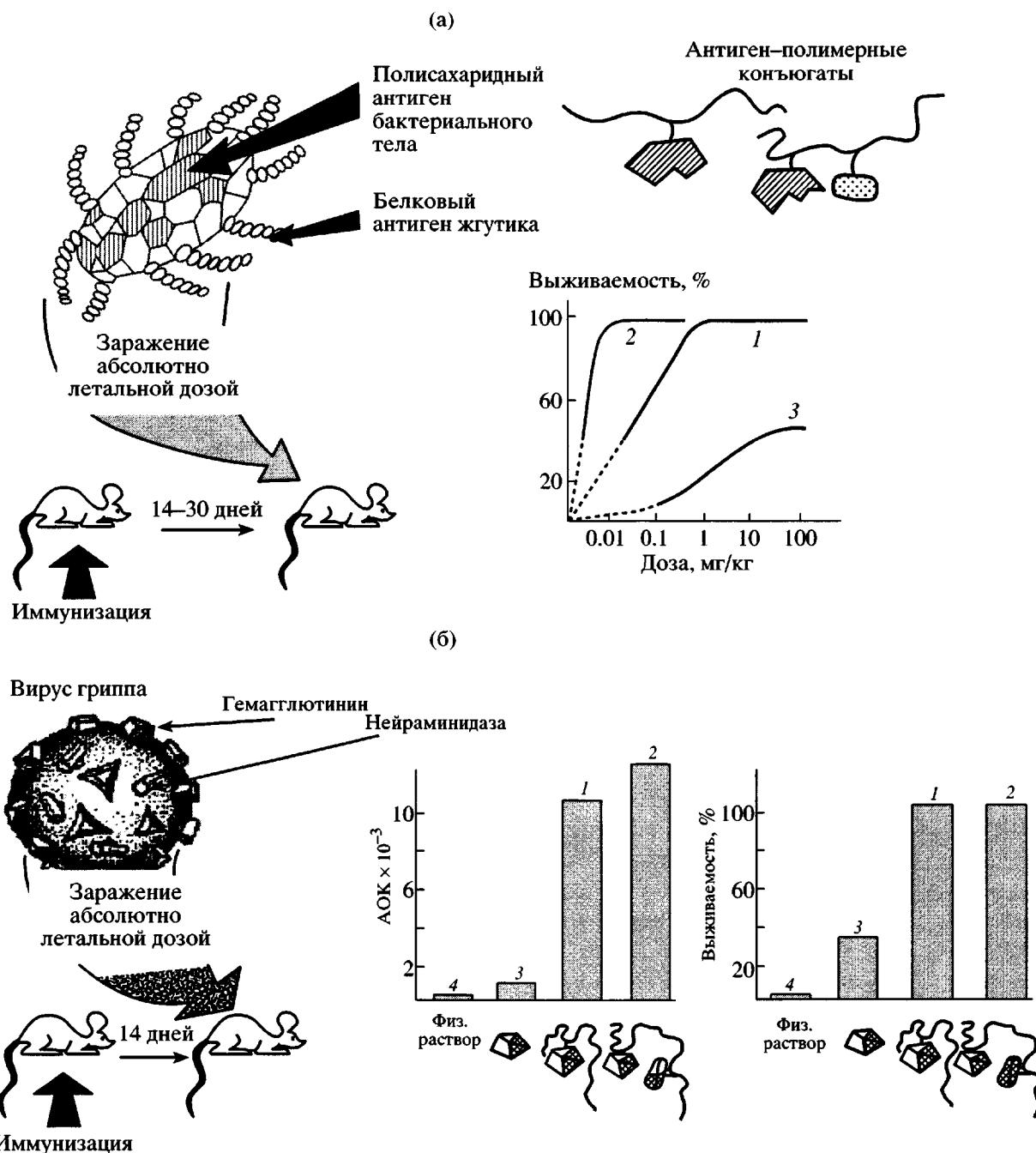


Рис. 15. Протективное действие конъюгированной противосальмонеллезной (а) и противогриппозной вакцины (б). Пояснения в тексте.

бактерий или вирусов. Иными словами, могут ли такие конъюгаты служить в качестве вакцин для профилактики инфекционных заболеваний. Понятно, что ответ должен был определить перспективу практического применения нового семейства иммуногенов.

Сальмонеллез стал первой из испытанных инфекций. Подопытным мышам вводили две разно-

видности конъюгатов (рис. 15а). В одном из вариантов к сополимеру АК-ВП в качестве антигена пришивали полисахарид, выделенный из тела бактерий (иммуноген 1), в другом – этот же полисахарид и еще флагеллин, белок из бактериальных жгутиков (иммуноген 2). Через определенный промежуток времени после иммунизации (от 14 до 30 дней) мышей заражали абсолютно смертельной дозой бактерий, после чего все живот-

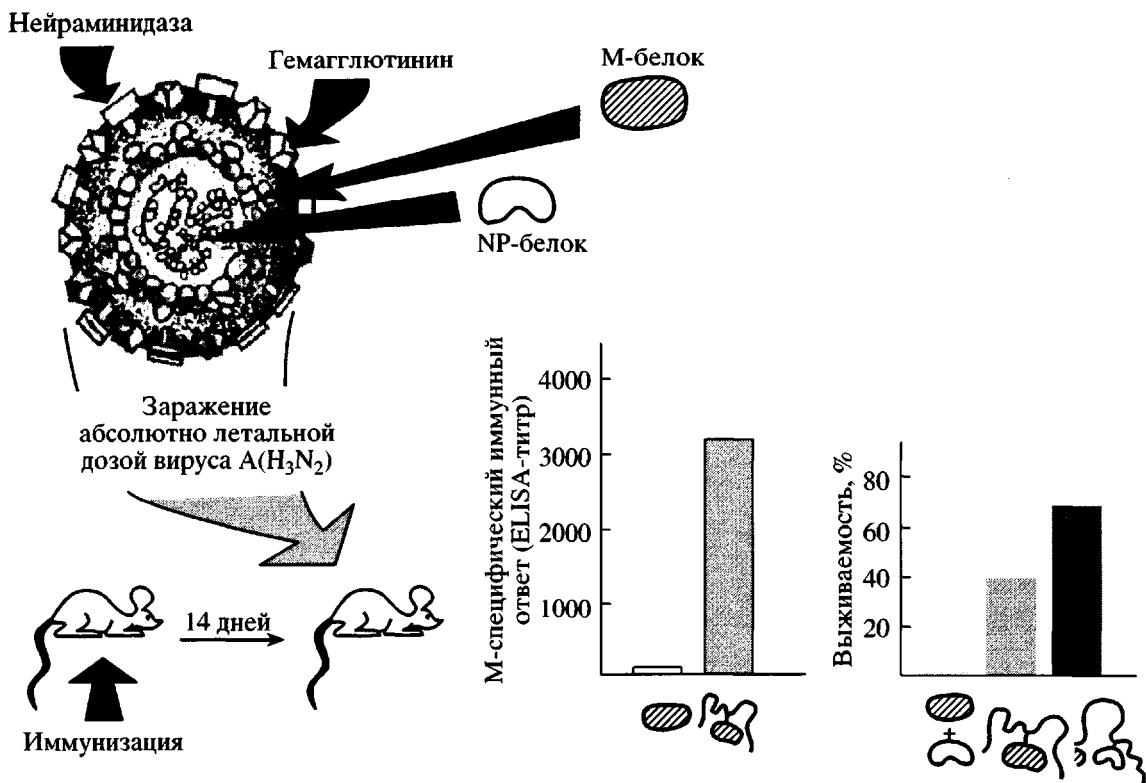


Рис. 16. Протективное действие конъюгированной противогриппозной вакцины, содержащей антигены вирусного штамма A(H₁N₁) при заражении вирусным штаммом A(H₃N₂). Пояснения в тексте.

ные контрольной группы, естественно, погибали. В отличие от этого все предварительно иммунизированные животные выздоравливали. Правда, в случае первого конъюгата, содержащего только один полисахаридный антиген, для достижения 100%-ной выживаемости требовалась иммунизация в 10 раз большей дозой, чем в случае второго (рис. 15, кривые 1 и 2). Иммунизация свободным полисахаридным антигеном в области разумных доз практически не защищала животных (кривая 3). Таким образом, было впервые показано, что антиген-СПЭ-конъюгаты действительно могут служить в качестве антибактериальных вакцин.

Защита от вирусных инфекций – задача, как известно, более сложная, чем от бактериальных. Поэтому Р.В. Петров и Р.М. Хайтов, руководители иммунологической части проекта, решили начать испытания с гриппа – одной из самых распространенных и социально значимых вирусных инфекций. Для этого химики синтезировали еще два конъюгата, присоединив к сополимеру АК-ВП в качестве антигенов в одном варианте гемагглютинин (конъюгат 1), а в другом – гемагглютинин и нейраминидазу (конъюгат 2), белки, лока-

лизованные на поверхности гриппозных вирионов (рис. 15б). Оба полученных конъюгата заставляли иммунную систему подопытных мышей производить очень большое число АОК по сравнению с ничтожно малым в контрольных опытах (рис. 15б). Как и в случае бактериальной инфекции, мышей иммунизировали конъюгатами, а затем заражали абсолютно смертельной дозой вируса. Результат превзошел все ожидания. Оба конъюгата защищали всех смертельно зараженных животных (рис. 15б) [8, 9].

Более того, оказалось, что защитным действием обладают даже антиген-СПЭ-конъюгаты, в которых в качестве антигенов использованы белки, не экспонированные на поверхности, а находящиеся внутри гриппозных вирионов (рис. 16). Эти белки называют “консервативными”, так как их структура при переходе от одного штамма вируса к другому меняется в значительно меньшей степени. Известно, что именно структурная изменчивость поверхностных белковых антигенов создает существенные дополнительные трудности для предупреждения эпидемий гриппа при обычной вакцинации. К числу консервативных

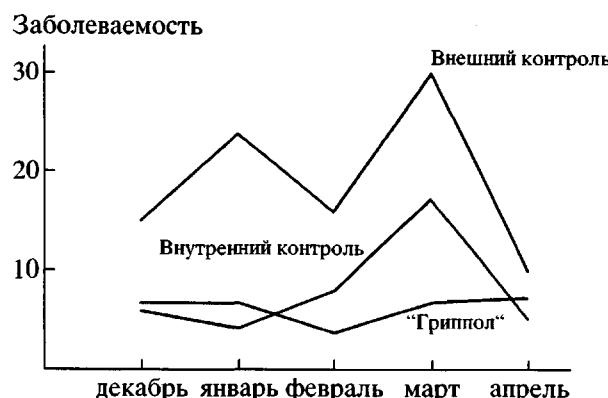


Рис. 17. Снижение заболеваемости людей, иммунизированных вакциной “Гриппол”. Пояснения в тексте.

белков гриппозного вируса относятся так называемые M- и NP-белки. В ходе описываемого исследования они были выделены из одного из вирусных штаммов ($A(H_1N_1)$) и присоединены к СПЭ. Подопытных мышей иммунизировали этими конъюгатами, а затем заражали абсолютно смертельной дозой вирусов другого штамма ($A(H_3N_2)$). Данные, приведенные на рис. 16, показывают, что наряду с колоссальным усилением M-специфического иммунного ответа выживаемость иммунизированных мышей достигает 40–60% при 100%-ной смертности в контрольных опытах.

“ГРИППОЛ” – ПЕРВАЯ ВАКЦИНА НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА

Результаты описанных выше исследований в совокупности открыли путь к разработке полимер-субъединичных вакцин для человека. Важнейшей практической предпосылкой для этого стал описанный выше “Полиоксидоний” – нетоксичный и быстро выводящийся из организма поликатионный иммуностимулятор, который, проходя все необходимые испытания, был разрешен для медицинского применения, в том числе для внутримышечного введения. На этом этапе было принято стратегическое решение – направить все усилия и средства на создание вакцины против гриппа – одной из самых распространенных и трудных для профилактики инфекций. Опыты на животных, о которых было рассказано в предыдущем разделе, позволяли надеяться на успех.

Вакцина “Гриппол” была получена путем коалентного связывания гемагглютинина и нейро-

аминида – белковых антигенов вируса гриппа, с полиоксидонием [37]. Сегодня она производится в промышленном масштабе на Уфимском заводе “Иммунопрепарат” и вот уже 7 лет широко используется в медицинской практике. За эти годы были вакцинированы около 50 миллионов реципиентов и получены обширные статистические данные, свидетельствующие о высокой эффективности и полной безвредности препарата. На основании этих данных Минздрав России рекомендовал “Гриппол” в качестве приоритетной противогриппозной вакцины для защиты всех групп населения. На рис. 17 приведены графики показателя заболеваемости гриппом в период эпидемии 1987–88 гг. на одну тысячу наблюдений у людей, вакцинированных “Грипполом”, не вакцинированных, но проживавших среди вакцинированных (внутренний контроль), в сравнении с никак не затронутыми вакцинацией (внешний контроль). Эти данные говорят сами за себя.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Остается подвести итог рассказанной здесь истории совместных поисков и многолетнего научного содружества группы химиков – сотрудников и выпускников химического факультета МГУ, и группы иммунологов Института иммунологии Минздрава РФ.

Был открыт механизм иммуностимулирующего действия полиэлектролитов, который состоит в усилении миграции Т- и В-клеток, клеточной кооперации, компенсации функции Т-клеток-помощников. В основе эффекта лежит кластеризация мембранных белков адсорбированным СПЭ, сопровождающаяся повышением проницаемости мембраны для ионов калия, натрия и кальция и активацией (Na^+ , K^+)- и Ca^{2+} -АТФаз. Важно подчеркнуть, что мембраноактивность и соответственно иммуностимулирующие действия, присущие, как оказалось, полиэлектролитам с весьма различным химическим строением звена, критически зависят от степени полимеризации молекуллярной цепи, т.е. обусловлены “полимерностью” как таковой. Это знание послужило фундаментом для поиска полиэлектролитной структуры, отвечающей всему комплексу фармакологических требований к медицинским препаратам. В результате был синтезирован новый полиэлектролит – сополимер, построенный из звеньев 1,4-этилен-пиперазин-N-оксида и (N-карбоксиметилен)-1,4-

этиленпиперазиний бромида ("Полиоксидоний"). Этот сополимер безвреден. Иммуностимулирующая активность в нем сочетается со способностью деструктировать в условиях организма и впоследствии полностью выводиться. "Полиоксидоний" разрешен и широко используется в России в качестве иммуностимулятора. Таким образом, впервые в медицинскую практику был внедрен синтетический полимер, биологическая активность которого обусловлена прямым физико-химическим воздействием макромолекул на клетки. До этого круг синтетических полимеров для медицины ограничивался веществами, использующимися в качестве конструкционных материалов, или химически нейтральными носителями низкомолекулярных лекарств.

Был сформулирован, экспериментально обоснован и подтвержден принцип создания конъюгированных полимер-субъединичных иммуногенов и вакцин путем присоединения антигенов к СПЭ-иммуностимуляторам. Иммуногенность и профилактические свойства антигенов, ковалентно связанных с СПЭ, возрастают в десятки и сотни раз. Существенно, что иммуногены и вакцины, построенные по этому принципу, действуют "в обход" IR-генов, обеспечивая тем самым сильный иммунитет даже у организмов, генетически слабо реагирующих на данный антиген.

Использование этого принципа позволило создать первую в мире полимер-субъединичную вакцину для человека. Пример вакцины "Гриппол" открыл путь для разработки вакцин нового поколения против других опасных инфекций. Завершается разработка (клинические и доклинические испытания) конъюгированных полимер-субъединичных вакцин против бруцеллеза, брюшного тифа, дизентерии, туберкулеза, ВИЧ, а также аллерговакцин (аллерготропинов).

Автор благодарит академика Р.В. Петрова и действительного члена Российской академии медицинских наук Р.М. Хайтова за плодотворные обсуждения в ходе подготовки этого материала к публикации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hanks E.G., Ainsworth T.J. // Rad. Res. 1967. V. 32, P. 367.
2. Воробьев А.А., Васильев Н.Н. Адьюванты. М.: Медицина, 1969.
3. Земсков В.М. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1972. № 3. С. 16.
4. Евдаков В.П., Гвоздецкий А.Н., Горохов А.А., Кабанов В.А., Петров Р.В. // Докл. АН СССР. 1974. Т. 214. № 4. С. 970.
5. Петров Р.В., Кабанов В.А., Гвоздецкий А.Н., Горохов А.А., Евдаков В.П., Кабанова Е.А. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1974. № 11. С. 37.
6. Diamantstein T., Vogt W., Rihl H., Bogert G. // Eur. J. Immunol. 1973. V. 3. P. 408.
7. Кабанов В.А., Мустафаев М.И., Некрасов А.В., Норимов А.Ш., Петров Р.В., Хайтов Р.М., Хаустова Л.И. // Докл. АН СССР. 1984. Т. 274. № 4. С. 998.
8. Петров Р.В., Кабанов В.А., Хайтов Р.М. // Иммунология. 1986. № 1. С. 5.
9. Kabanov V.A. // Makromol. Chem., Macromol. Symp. 1986. V. 1. P. 101.
10. Roitt I., Brostoff J., Male D.K. // Immunology. London; New York: Gover Med. Publ., 1985.
11. Хайтов Р.М. Физиология иммунной системы. М.: ВИНИТИ. 2001.
12. Кабанов В.А., Евдаков В.П., Мустафаев М.И., Антипина А.Д. // Молек. биол. 1977. Т. 11 С. 5.
13. Kabanov V.A., Zezin A.B., Mustafaev M.I., Kasaikin V.A. // Polymeric Amines and Ammonium Salts / Ed. by Goethals E.J. Oxford; New York: Pergamon Press. 1980. P. 173.
14. Зайцев В.С., Изумрудов В.А., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Докл. АН СССР. 1992. Т. 322. № 2. С. 318.
15. Атауллаханов Р.И., Петров Р.В., Хайтов Р.М., Атауллаханов Ф.И., Абдуллаев Д.М. // Докл. АН СССР. 1984. Т. 274. № 2. С. 479.
16. Петров Р.В., Хайтов Р.М., Атауллаханов Р.И. // Биол. мембранны. 1984. Т. 1. С. 599.
17. Разводовский Е.Ф., Берлин Ал.Ал., Некрасов А.В., Пущаева Л.М., Пучкова Н.Г., Ениколопян Н.С. // Высокомолек. соед. А. 1973. Т. 15. № 10. С. 2219.
18. Разводовский Е.Ф., Берлин Ал.Ал., Некрасов А.В., Пономаренко А.Т., Пущаева Л.М., Пучкова Н.Г., Ениколопян Н.С. // Высокомолек. соед. А. 1973. Т. 15. № 10. С. 2233.

19. Rasvodovskii E.F., Nekrasov A.V., Pushchaeva L.M., Morozova L.S., Markevich M.A., Berlin Al.Al., Ponomarenko A.T., Enicolopyan N.S. // J. Macromol. Sci., Chem. 1984. V. 8. № 2. P. 241.
20. Пучкова Н.Г., Некрасов А.В., Разводовский Е.Ф., Эльцефон Б.С. // Высокомолек. соед. А. 1980. Т. 22. № 6. С. 1281.
21. Pat. 5.503.830 USA. 1996.
22. Некрасов А.В., Пучкова Н.Г. // Высокомолек. соед. Б. 1983. Т. 25. № 9. С. 691.
23. Izumrudov V.A., Savitskii A.P., Bakeev K.N., Zezin A.B., Kabanov V.A. // Makromol. Chem., Rapid Commun. 1984. V. 5. P. 709.
24. Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. А. 1994. Т. 36. № 2. С. 183.
25. Бакеев К.Н., Изумрудов В.А., Кучанов С.И., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 300. № 1. С. 132.
26. Ярославов А.А. 1988 (неопубликованные данные).
27. Сухишвили С.А., Полинский А.С., Ярославов А.А., Чечик О.С., Кабанов В.А. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 302. № 2. С. 381.
28. Yaroslavov A.A., Polynsky A.S., Sukhishvili S.A., Kabanov V.A. // Makromol. Chem., Macromol. Symp. 1989. V. 26. P. 265.
29. Kabanov V.A., Yaroslavov A.A., Sukhishvili S.A. // J. Controlled Release. 1996. V. 39. P. 173.
30. Kabanov V.A., Yaroslavov A.A., Boronina O.V., Sukhishvili S.A. // J. Bioactive Compatible Polym. 1995. V. 10. P. 41.
31. Петров Р.В., Евдаков В.П., Хаитов Р.М., Филатова Е.Д., Алексеева Н.Ю., Савинова И.В., Кожинова Е.В., Воронцов Е.Д. // Докл. АН СССР. 1977. Т. 236. № 5. С. 1260.
32. Кабанов В.А., Мустафаев М.И., Норимов А.Ш., Петров Р.В., Хаитов Р.М. // Докл. АН СССР. 1978. Т. 243. № 5. С. 1330.
33. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Норимов А.Ш., Кабанов В.А., Мустафаев М.И., Филатова Е.Д. // Докл. АН СССР. 1979. Т. 249. № 1. С. 249.
34. Виноградов И.В., Кабанов В.А., Мустафаев М.И., Норимов А.Ш., Петров Р.В., Хаитов Р.М. // Докл. АН СССР. 1982. Т. 263. № 1. С. 228.
35. Sela M. // Science. 1969. V. 166. P. 1365.
36. Benacerraf B. // Ann. Immunol. C. 1974. V. 125. P. 143.
37. Petrov R.V., Kabanov V.A., Khaitov R.M., Nekrasov A.V., Ataullakhanov R.I. // Allergy and Clinical Immunology. 2003. V. 15. P. 56.

From Synthetic Polyelectrolytes to Polymer-Subunit Vaccines

V. A. Kabanov

Faculty of Chemistry, Moscow State University,
Leninskie gory, Moscow, 119992 Russia

Abstract—Long-term studies on the use of synthetic polyelectrolytes in immunology are surveyed. It was found that quite various linear synthetic polyelectrolytes that are not structural analogues of biopolymers and, thus, are foreign to the immune system have a very significant effect on this system when introduced into the body. They noticeably enhance the formation of stem cells (precursors of all functional immune cells) in the bone marrow and their subsequent migration and population throughout the body. In addition, synthetic polyelectrolytes, not being antigens themselves, increase several times the production of antibodies complementary to introduced antigens, i.e., act as immune response stimulants when introduced together with typical antigens (proteins, natural bacterial polysaccharides, and their synthetic analogues). Later, it was shown that synthetic polyelectrolytes trigger the immune system via a mechanism other than the one usually realized in nature. Therefore, the efficiency of the defense reaction of the body becomes uncontrollable by immune response genes. The response turns out to be equally strong in both genetically well-protected and ill-protected species. Alternative triggering is based on the general properties of linear polyelectrolytes to aggregate proteins they have sorbed (in this case, proteins that are built in the cell membranes of B cells). A nontoxic immune modulator, the copolymer of 1,4-ethylenepiperazine N-oxide with (N-carboxymethylene)-1,4-ethylenepiperazinium bromide (trade name Polyoxydonium), was invented, which was allowed for administration to humans. However, the cardinal step on the way to next-generation vaccines was revealing the biological effect of conjugation of synthetic polyelectrolytes with bacterial antigens. Unlike simple mixtures, conjugates enhance tens and hundreds times an immune response. In this case, preliminary immunization protects animals against an absolutely lethal dose of corresponding bacteria and viruses. A Polyoxydonium conjugate with hemagglutinin and neuraminidase (influenza virus protein subunits) has become the world first non-Pasteurian vaccine Grippol successfully used in Russia (about fifty million vaccinations over the last seven years). The physicochemical mechanisms of biological action of these compounds and prospects for use of this approach are discussed.