

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-330

**ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ ПЕПТИДОВ БЛОКИРОВАТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ
ЛИГАНД-РЕЦЕПТОР НА ПРИМЕРЕ КОРЕГУЛЯТОРНЫХ МОЛЕКУЛ CTLA4-B7-2****STUDY OF THE ABILITY OF PEPTIDES TO BLOCK LIGAND-RECEPTOR INTERACTION
USING THE EXAMPLE OF COREGULATORY MOLECULES CTLA4-B7-2**Е. А. Колосова^{1,2}, П. В. Колосов², Д. Н. Щербаков^{1,2}¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово²Алтайский государственный университет, Центр рекомбинантных технологий, БарнаулE. A. Kolosova^{1,2}, P. V. Kolosov², D. N. Shcherbakov^{1,2}¹State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo²Altai State University, Center of Recombinant Technologies, Barnaul

✉ natdobryak@gmail.com

Аннотация

Определена константа диссоциации реакции лиганд-рецептор коммерческих молекул hB7-2 (CD86) — hCTLA-4-Fc (CD152) в прямом твердофазном иммуноферментном анализе. Определены условия полумаксимальной ингибирующей концентрации hCTLA-4-Fc (CD152) в прямом твердофазном иммуноферментном анализе. Проведена оценка ингибирующих способностей пептидов: p101 (CLARCLGRC), p102 (CPSASSQLTC), p106 (AHIEVVSP) и p108 (QMPALMQQ), отобранных с помощью аффинной селекции в конкурентном иммуноферментном анализе.

Abstract

The ligand-receptor dissociation reaction constant of the commercial molecules hB7-2 (CD86) — hCTLA-4-Fc (CD152) was determined by direct ELISA. The conditions for achieving the half-maximal inhibitory concentration of hCTLA-4-Fc (CD152) in a direct ELISA were determined. The inhibitory abilities of peptides p101 (CLARCLGRC), p102 (CPSASSQLTC), p106 (AHIEVVSP) and p108 (QMPALMQQ), selected by affinity selection, were assessed in a competitive ELISA.

Снижение показателя смертности от онкологических заболеваний подразумевает два пути. Во-первых, это поиск новых способов диагностики, которые в полной мере и на ранних стадиях позволят диагностировать заболевания. Во-вторых, это разработка терапевтических препаратов, которые могут дать отпор раковым клеткам. Одними из таких препаратов являются пептиды. Их поиск и использование как средство в иммунотерапии является актуальной задачей. Ранее учеными из Российско-американского противоракового центра (РАПИЦ) были найдены пептиды, которые специфически взаимодействуют с молекулами иммунного ответа [1].

Работа с пептидами как с молекулами, препятствующими образованию нежелательного иммунного ответа, открывает большие возможности для успешного лечения рака. Использование таких пептидов путем разрушения взаимодействия hCTLA-4-Fc (CD152) — hB7-2 (CD86) позволит добиться успешных результатов и выйти на новый уровень в иммунотерапии.

Таким образом, целью данного исследования было оценить способность пептидов p101 (CLARCLGRC), p102 (CPSASSQLTC), p106 (AHIEVVSP) и p108 (QMPALMQQ) блокировать взаимодействие корегуляторных молекул hB7-2 (CD86) — hCTLA-4-Fc (CD152) с помощью иммуноферментного анализа.

Константы диссоциации между антигеном активации В-лимфоцитов hB7-2 (CD86) (CD86) и гликопротеином цитотоксических Т-лимфоцитов hCTLA-4-Fc (CD152) определяли с помощью прямого ИФА.

Для иммуноферментного анализа использовали высокосорбционные 96-луночные планшеты (Sovtech, Россия). Препарат hB7-2 (CD86) (R&D Systems, США) сорбировали 500 нг/луночка в НФР в объеме 100 мкл/луночка при 4 °С в течение ночи. После блокировали блокирующим раствором, содержащим 1% сухое молоко (PanReac AppliChem, Испания) в НФР в объеме 150 мкл/луночка в течение 1 часа при 37 °С в термошейкере. Далее троекратно промыли на вошере (BioTek, Россия) промывочным раствором, содержащим 0,05% полисорб 20 в НФР с рН 7,3.

Далее добавили препарат hCTLA-4-Fc (CD152), содержащий константную область человека, в диапазоне от 500 нг/луночка до 15,26 нг/луночка и инкубировали в термошейкере 2 часа при 37 °С. В качестве положительного контроля использовали препарат «Иммуноглобулин человека нормальный» («Микроген», Россия). После трое-

кратно промыли на вошере (BioTek, Россия) промывочным раствором, содержащим 0,05% полисорб 20 в НФР с pH 7,3.

Конъюгат вторичных козьих антител против константной области человеческого антитела, меченого пероксидазой хрена, наносили в разведении 1:10000 в блокирующем растворе по 100 мкл/лунка и инкубировали в течение 1 часа при 37 °С в термошейкере. После шестикратной промывки инкубировали с раствором ТМБ по 50 мкл/лунка в течение 20 минут при комнатной температуре и остановили реакцию добавлением 1М H₂SO₄. Регистрацию сигнала проводили при 450 нм на спектрофотометре (Bio-Rad, США).

Константой диссоциации является та концентрация лиганда (hCTLA-4-Fc (CD152)), при которой половина рецепторов (hB7-2 (CD86)) занята и соответствует концентрации 125 нг/лунка hCTLA-4 (CD152) (рис. 1). Таким образом, оптимальными условиями для ИФА с полумаксимальной ингибирующей концентрацией является концентрация 125 нг/лунка hCTLA-4-Fc (CD152) при концентрации hB7-2 (CD86) 500 нг/лунка и разведении конъюгата вторичных антител 1:10000.

Для количественной оценки влияния пептидов на взаимодействие между молекулами hB7-2 (CD86) и hCTLA-4-Fc (CD152) использовали конкурентный ИФА.

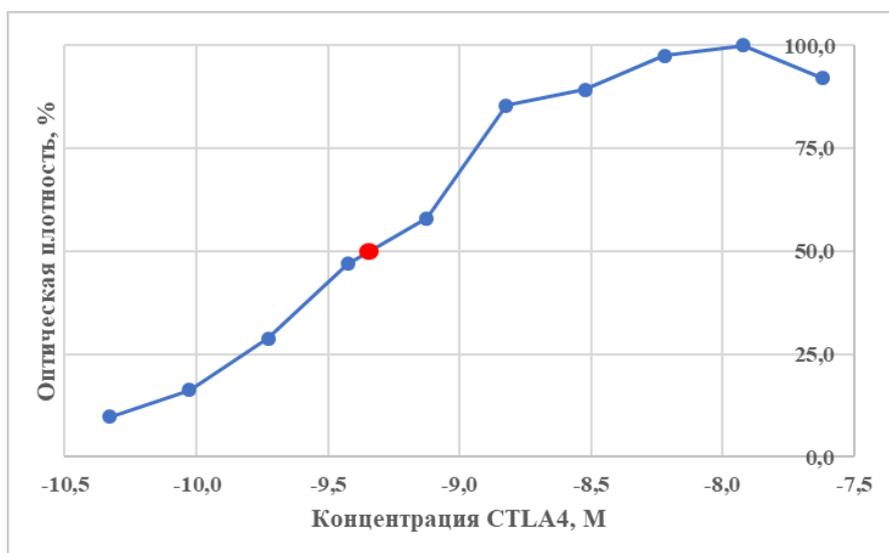


Рис. 1. Зависимость доли связанных молекул hB7-2 (CD86) от десятичного логарифма соответствующей концентрации hCTLA-4-Fc (CD152). Красной точкой отмечена константа диссоциации

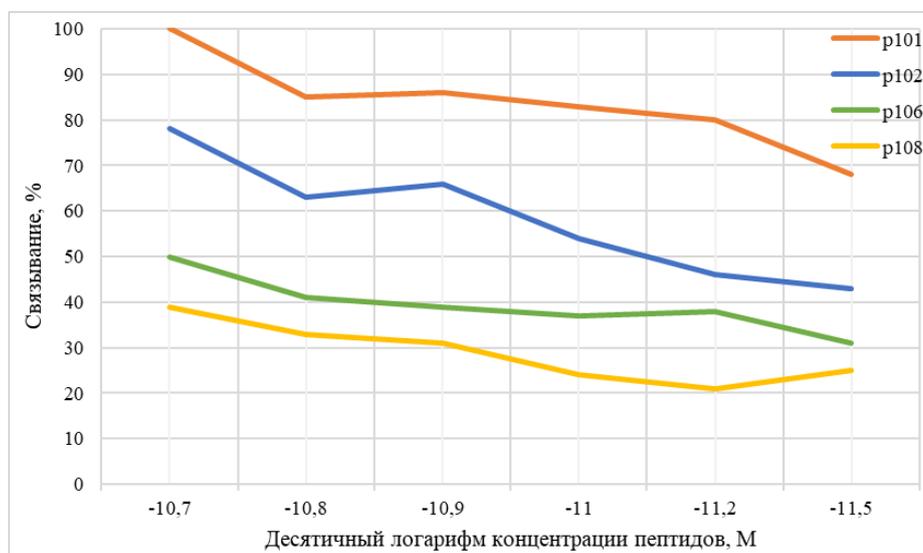


Рис. 2. Зависимость доли связанных молекул hB7-2 (CD86) от десятичного логарифма соответствующей концентрации пептидов

На рис. 2 отражена зависимость доли связанных молекул hB7-2 (CD86) от десятичного логарифма соответствующей концентрации пептидов p101 (CLARCLGRC), p102 (CPSASSQLTC), p106 (AHIEVVSP) и p108 (QMPALMQQ).

Константа диссоциации реакции лиганд-рецептор коммерческих молекул hB7-2 (CD86) — hCTLA-4-Fc (CD152) в прямом твердофазном ИФА соответствует концентрации 125 нг/лунка hCTLA-4 (CD152). Оптимальными условиями для ИФА с полумаксимальной ингибирующей концентрацией является концентрация 125 нг/лунка hCTLA-4-Fc (CD152) при концентрации hB7-2 (CD86) 500 нг/лунка и разведении конъюгата вторичных антител 1:10000. Проведена оценка ингибирующей способности пептидов: p101 (CLARCLGRC), p102 (CPSASSQLTC), p106 (AHIEVVSP) и p108 (QMPALMQQ). Пептид p108 (QMPALMQQ) показал наилучший результат связывания с молекулами hB7-2 (CD86), чем пептиды p101 (CLARCLGRC), p102 (CPSASSQLTC), p106 (AHIEVVSP) на 60, 49 и 22 % соответственно.

Литература

1. Kolosova E.A. et al. Search for Peptides Specifically Binding with the B7-2 Costimulatory Molecule // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2021. Vol. 47. P. 1220–1224.