

НА ПЕРЕДНЕМ КРАЕ НАУКИ

Этот элегантный фаговый дисплей

Технологией фагового дисплея в мире занимаются десятки научных подразделений. Среди них — лаборатория молекулярной иммунологии ИХБФМ СО РАН под руководством доктора биологических наук Нины Викторовны Тикуновой, созданная в институте в 2008 году. В её составе — чуть более десяти человек (не считая студентов), которые активно работают в том числе и по данной тематике.



Исследования фагового дисплея в Новосибирске ведутся достаточно давно, начинали же их в Научно-исследовательском конструкторско-технологическом институте биологически активных веществ (НИКТИ БАВ) на «Векторе». Говоря научным языком, фаговый дисплей — это метод изучения белок-белковых, белок-пептидных и ДНК-белковых взаимодействий, использующий бактериофаги для того, чтобы соотнести белки и генетическую информацию, кодирующую их. А директор Института химической биологии и фундаментальной медицины академик В.В. Власов определил его как «наиболее элегантную из технологических селекса», т.е. отбора молекул, которые обладают нужными для исследователя свойствами.

Об исследованиях, проводимых в лаборатории, и о методологии фагового дисплея рассказывает д.б.н. **Н.В. Тикунова**.



— **Нина Викторовна, каковы основные принципы фагового дисплея и в чем его элегантность?**

— Суть технологии заключается в следующем. На поверхности нитчатого бактериофага, который состоит из нескольких тысяч молекул белка и живет в клетках кишечной палочки *Escherichia coli*, присутствующей в организме каждого человека, можно поместить различные структуры — чужеродные короткие пептиды и более крупные белковые молекулы. При этом в геноме данного нитчатого бактериофага будет закодирована информация об этих пептидах или белках. Такое использование поверхности нитчатого бактериофага возможно из-за определенных его свойств. Во-первых, нитчатый бактериофаг — вирус, который не убивает клетки *E. coli*, хотя обычно именно это является основной «задачей» бактериофагов. Во-вторых, в геном нитчатого бактериофага можно легко встроить целевые генетические последовательности, короткие и длинные, которые и будут кодировать те пептиды и белки, которые мы хотели бы представить на поверхности фага.

Короткие пептиды подходят не для всех задач, но с их помощью можно определить места на молекулах вирусных белков, с которыми связываются антитела. Это очень важно, потому что как раз эти места отвечают, например, за хорошую работу вакцины. И определяя, с какими фрагментами связывается иммунная система организма, чтобы защитить нас, на какие фрагменты вирусов направлены ее действия, можно выявить ряд свойств, необходимых при разработке вакцин. Размещение на поверхности нитчатого бактериофага более крупных белковых молекул открывает совсем другие возможности. С помощью такого подхода можно отбирать, например, необходимые лекарственные вещества или полезные для биотехнологии ферменты.

А элегантность фагового дисплея заключается в том, что эта технология позволяет выбрать из миллиарда различных молекул именно ту единственную, которая нужна для лечения того или иного заболевания или необходима для биотехнологического производства. Причем для такого отбора не требуется супердорогое оборудование — тех-

нология легко воспроизводится в любой молекулярно-биологической лаборатории.

— **В каких сферах она находит применение?**

— Одно из направлений — это размещение на поверхности нитчатого бактериофага молекул антител. В этом случае возможно получение терапевтических антител для лечения ряда заболеваний. Такие антитела необходимы, если организм человека по какой-то причине не вырабатывает их сам или просто ещё не успел выработать. Введение антител извне может либо предотвратить развитие болезни, либо значительно облегчить состояние пациента. В других странах уже производят антитела, полученные таким образом, для лечения некоторых аутоиммунных заболеваний, например, ревматоидного артрита или рассеянного склероза. Состояние больного при их применении значительно улучшается, но курс лечения рассчитан на один-два года. В нашей стране такие препараты не производят, они покупаются за рубежом, причем стоимость двухлетнего курса лечения составляет от 800 тысяч до 2 миллионов рублей.

Одна из основных задач нашей лаборатории — создание антител против клещевого энцефалита. Сейчас в случае укуса клеща, несущего вирус клещевого энцефалита, вводят противоклещевой гамма-глобулин, получаемый из донорской крови. Пока это единственный специфический препарат, хотя в Европе его применение запрещено, поскольку при ряде заболеваний введение таких антител может привести к более тяжелому течению болезни — всё-таки это препарат крови со всеми вытекающими последствиями биологической опасности. Хотя по наблюдениям российских врачей, давно использующих этот препарат, подобного пока не наблюдалось.

Следует сказать, что клещевой энцефалит в России — гораздо более тяжелое заболевание, чем в Европе, потому что там циркулируют другие штаммы вируса: они могут вызывать головную боль, повышение температуры, а не такие последствия, как у нас — приходится буквально бороться за жизнь людей. И если бы препарат для спасения можно было готовить не из крови, причем он обладал бы такими же протективными, вируснейтрализующими свойствами, это было бы более безопасно. Важно и то, что в отличие от лекарств, которые надо принимать годами, данное средство используется в случае укуса один-два раза, т.е. это препарат для экстренных случаев. И схема его применения была бы такой же, как у противоклещевого гаммаглобулина.

— **Как известно, клещи переносят и боррелиоз, и болезнь Лайма. В этих случаях ваш препарат тоже может помочь?**

— Достоинство фагового дисплея в том, что из гигантского множества молекул он позволяет отобрать одну высокоспецифичную молекулу. Поэтому отобранное антитело против вируса клещевого энцефалита не будет работать ни при боррелиозе, ни при болезни Лайма. Данные заболевания вызываются совсем другими организмами, и для их лечения необходимо использовать другие препараты, найти которые тоже возможно с помощью фагового дисплея. Известно, что после заражения боррелиозом у человека впоследствии может развиться аутоиммунное заболевание, поскольку этот патоген способен так нарушить функционирование нашей иммунной системы, что через некоторое время она начнет работать против нас. Поэтому очень важно, чтобы в любом лекарстве искусственные антитела были направлены только против своего патогена, и за разработку антител против болезни Лайма и боррелиоза надо браться, хорошо исследовав фундаментальные процессы. Кстати, в Институте химической биологии и фундаментальной медицины такие исследования ведутся в лаборатории микробиологии с помощью новейших метагеномных подходов, которые помогут понять, что в структуре боррелий может вызвать такие осложнения.

— **На какой стадии разработки средства против клещевого энцефалита на-**

ходится сейчас лаборатория вирусной иммунологии?

— На стадии подхода к доклиническим испытаниям. Уже прошли лабораторные эксперименты на животных, показавшие, что разрабатываемые нами препараты безвредны для них. Про побочные эффекты для людей мы пока ничего не можем сказать, но надемся, что их не будет, благодаря однократному применению (ведь чем дольше препарат принимается, тем больше вероятности, что возникнут побочные эффекты).

— **Проблема клещевого энцефалита для Сибири — острейшая! По вашему мнению, как скоро эти препараты появятся на рынке?**

— Многое уже не зависит от наших усилий. Дело в том, что в России существуют очень жесткие правила испытания препаратов, и я считаю, что это правильно. Так что все процедуры могут занять несколько лет — без официальных доклинических и клинических испытаний, а также множества согласований от продаваться не будет. А испытания эти стоят очень дорого. И чем больше выделяется денег под конкретный препарат, тем лучше. Вот, к примеру, в свое время Правительство РФ выделило достойные денежные средства для разработки и проведения испытаний вакцин против СПИДа, и именно это помогло так хорошо продвинуть работы в данном направлении, провести клинические испытания. Кстати, в лекарстве против СПИДа в фундаментальных, предварительных исследованиях также использовали фаговый дисплей, который опирается на экспонирование коротких фрагментов. Правда в дальнейшем, при разработке вакцины, этот подход не применялся.

— **Какие ещё проводите исследования, связанные с фаговым дисплеем?**

— С помощью технологии фагового дисплея мы пытаемся понять, как изменяется работа иммунной системы при аутоиммунном заболевании, что к этому приводит. В частности, изучаем антитела против цитокинов. Цитокины — это биологически активные вещества пептидной природы, участвующие в формировании и регуляции защитных систем организма (интерфероны, интерлейкины и др.). В 80-90 гг. прошлого века во всем мире было распространено направление, гласящее, что некоторые заболевания можно лечить введением препаратов, основанных на цитокинах. Позднее оказалось, что зачастую введение самих цитокинов может вызвать серьезные побочные эффекты. Это можно объяснить следующим образом. Цитокины настолько важны для нашего организма, что он старается очень тонко сбалансировать их концентрации в организме, а внешнее их введение в лечебных целях очень сильно меняет этот баланс и приводит к негативным последствиям.

Со временем учёные пришли к выводу, что безопаснее лечить не самими цитокинами, а препаратами, которые их контролируют. Идеальный вариант в этом случае — антитела. Это те молекулы, которые наш организм вырабатывает в норме, и существуют природные механизмы их выведения. Собственно антитела — это идеальные лекарственные молекулы, выработанные самой эволюцией. Причем не столько для человека, а значительно раньше, чем он возник, для спасения живых организмов. Именно поэтому лечение антителами следует признать оптимальным. Как только мы начинаем принимать препараты химического ряда, сразу всплывает проблема выведения их из организма. Поэтому у обычных лекарств так много противопоказаний, ограничений и т.д. А антитела, попадаящие в организм, выводятся естественным путем — это то, что эволюция сделала до нас. И поэтому лечение таким препаратом самое физиологичное и нормальное. Может быть, именно поэтому для нас так привлекательно направление разработки таких препаратов.

Хотелось бы упомянуть также о биологической безопасности — вопрос об этом периодически поднимается. Насколько безопасны данные работы для экологии, для окружающей среды? Сейчас в нашей стране очень жесткие нормы биобезопасности, и с

каждым годом они ужесточаются, что, безусловно, правильно, но усложняет работу исследователей. Мы получаем и исследуем рекомбинантные антитела на основе рекомбинантных фагов, однако на любой вопрос — «не выпускаете ли вы в природу какие-либо генномодифицированные организмы?» — мы точно можем ответить — «нет!». В Институте химической биологии и фундаментальной медицины уделяют достаточно внимание соблюдению правил биобезопасности, так что ничего генномодифицированного мы в природу не выпускаем. Ну и, конечно, не собираемся лечить людей этими генномодифицированными фагами. Фаги — всего лишь первый этап на стадии исследования, на пути создания рекомбинантных антител. Просто мы на какой-то момент размещаем на их поверхности структуры, которые с помощью фагового дисплея изучаем. Если свойства нас удовлетворяют, то структура снимается с поверхности, и дальше изучается уже само антитело.

— **Есть ли у вас планы, проекты, к которым только собираетесь приступить?**

— Нам, в первую очередь, всегда были интересны фундаментальные исследования — как это устроено, как существует в организме. Большинство наших проектов так или иначе связаны с получением фундаментальных знаний. Ведь только таким образом, если наталкиваешься на интересный выход, можно переключиться на создание того, что способно в перспективе дать нечто более весомое, имеющее практическое применение. Например, недавно было обнаружено, что часть антител обладает свойствами ферментов, т.е. они способны катализировать какие-то реакции в организме (сначала никто не верил, что такое возможно, но потом на этот эффект натолкнулись несколько научных групп). Антитела, конечно, не такие успешные ферменты как те, которые на самом деле существуют в нашем организме, но тем не менее...

Если же в одной молекуле совместить свойства антитела и даже слабого фермента, это может дать широкие возможности не только в фундаментальных, но и в прикладных исследованиях. Оказалось, что эти антитела, обладающие ферментативными функциями, возникают при ряде патологических изменений. И наш будущий интерес — в исследовании именно таких антител. Что касается их практического применения, то, во-первых, это диагностическая область. Те же самые аутоиммунные заболевания диагностируются только тогда, когда симптомом комплекс уже достаточно серьезно развился, и человек страдает от болезни. Если уметь, что все мы, россияне, достаточно терпеливы, на раннюю диагностику рассчитывать не приходится. А в случае разработки соответствующих тест-систем можно будет во время плановых медосмотров в штатном режиме, например, раз в год, наряду с общим анализом крови, делать анализ на маркеры таких заболеваний. Тогда и лечение было бы намного проще осуществлять.

— **У вашей лаборатории много научных партнеров?**

— Что касается мировых лабораторий, с ними сотрудничать проблематично, потому что многие научные группы, начинавшие с фундаментальных исследований, преобразовались в коммерческие структуры. Ведь данные технологии дают очень хороший коммерческий выход не только в препаратах, но и в нанотехнологиях, наноматериалах. Скажем, если нитчатый бактериофаг покрыть частичками какого-то металла, а потом поместить его в печь, то получатся нанотрубочки идеальной формы, которые можно использовать в разных сферах. Поэтому многие лаборатории закрыты для сотрудничества, можно только покупать у них готовые продукты. В нашей стране «сообщество фагового дисплея» не очень большое. Тем не менее, мы взаимодействуем с Институтом биорганной химии в Москве: у нас есть совместные работы, мы дополняем друг друга. Это некоммерческое сотрудничество заинтересованных ученых, которым одинаково интересно, как устроен мир.

**Ю. Александрова, «НБС»
Фото В. Новикова**