

## ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИТЕЛА К C5a АНАФИЛОТОКСИНУ КОМПЛЕМЕНТА

© 2019 г. А. А. Василишина\*, А. В. Демьянов, В. С. Монахова, А. В. Жахов, А. В. Трофимов, Е. С. Денисенко, К. А. Некрасова, С. В. Родин, А. С. Симбирцев, А. М. Ищенко

\*E-mail: a.a.vasilishna@hpb.spb.ru

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов»  
Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 26.03.2019

Получены моноклональные мышинные антитела к C5a анафилотоксину человека, в последовательностях легкой и тяжелой цепей которых была произведена замена константных областей на константные области иммуноглобулина G человека с целью получения химерных (мышь—человек) антител.

**Ключевые слова:** комплемент, моноклональные антитела, C5a анафилотоксин человека

DOI: 10.31857/S102872210006722-9

**Адрес:** 197110 Санкт-Петербург, ул. Пудожская, д. 7, ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ «ФМБА России. Василишина Анастасия Анатольевна. Тел. 8(812) 499 16 61.

**E-mail:** a.a.vasilishna@hpb.spb.ru

**Авторы:**

**Василишина А. А.**, биолог лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Демьянов А. В.**, начальник лаборатории иммунофармакологии ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Монахова В. С.**, биолог лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Жахов А. В.**, в.н.с. лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Трофимов А. В.**, руководитель группы лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Денисенко Е. С.**, проектный менеджер ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Некрасова К. А.**, заместитель начальника отдела организации НИР ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Родин С. В.**, руководитель группы лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Симбирцев А. С.**, член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, научный руководитель ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Ищенко А. М.**, к.б.н., начальник лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

Бактерии и их производные могут активировать комплемент тремя известными путями: классическим, лектиновым и альтернативным. Во всех случаях в результате активации происходит образование анафилотоксинов C3a, C4a и C5a. В норме собственные клетки организма хозяина защищены от активирующего действия комплемента регуляторными белками. Однако в патогенезе воспалительных заболеваний продукты активации комплемента являются одними из основных провоспалительных агентов. Накопление анафилотоксинов, в особенности C5a, сопровождается эскалацией воспаления и часто приводит к тяжелому течению болезни [1, 2].

Объектом настоящего исследования является нейтрализующее антитело к анафилотоксину C5a, поскольку нейтрализация или удаление избытка этого анафилотоксина положительно влияет на исход тяжелых воспалительных заболеваний, включая ССВО и сепсис [3].

Специфическая экстракорпоральная гемокоррекция является оптимальным и современ-

ным методом удаления патогенетических агентов, поэтому **целью** настоящей работы стало получение рекомбинантных химерных антител к C5a анафилотоксину комплемента человека с экспрессией в клетках НЕК293 для дальнейшего создания иммуносорбента, допустимого к применению в клинической медицине.

Для определения нуклеотидной и аминокислотной последовательности антитела к C5a, полученного в клетках мышинной гибридомы, было выполнено выделение тотальной РНК соответствующей гибридомы и получение на ее основе кДНК. Далее методом ПЦР с использованием набора вырожденных праймеров амплифицировали фрагменты кДНК, кодирующие переменные участки тяжелой и легкой цепи иммуноглобулинов. Полученные ПЦР-продукты очищали и секвенировали по методу Сэнгера. Структурно-функциональный анализ полученных последовательностей, который проводили с помощью онлайн сервисов IMGT/V-QUEST и IgBLAST, показал, что все ПЦР-продукты соответствовали одной тяжелой цепи, одной легкой каппа цепи мышинного иммуноглобулина и 1 aberrантной легкой цепи из миеломы Sp2/0.

Для получения химерных генов была проведена амплификация сигнальной последовательности, последовательностей генов *IGHG1* и *IGKC*, кодирующих константные области тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина человека, и последовательностей переменных доменов тяжелой и легкой цепи кандидатного мышинного иммуноглобулина. В качестве матрицы для амплификации сигнального пептида и константных доменов были использованы плазмиды с химерными антителами к другому антигену, разработанные нами ранее. Дизайн праймеров для амплификации данных фрагментов был осуществлен таким образом, чтобы полученные ПЦР-продукты частично перекрывались между собой. Далее была произведена сборка соответствующих фрагментов, имеющих частичное перекрытие, методом ПЦР. Полученные последовательности химерных генов тяжелой и легкой цепи были лигированы в неэкспрессионный вектор pJET и клонированы в *E.coli*. Далее была произведена селекция клонов с нужной последовательностью с помощью ПЦР и секвенирования. Затем химерные гены были переклонированы по сайтам рестрикции

NheI и NotI в экспрессионный плазмидный вектор pOptiVec. После селекции клонов плазмидная ДНК была наработана в *E.coli* и выделена с высокой степенью очистки для трансфекции. Результирующие векторы были обозначены pOptiVec/C5a2H и pOptiVec/C5a2L.

Векторы pOptiVec/C5a2H и pOptiVec/C5a2L были использованы для временной экспрессии в клетках линии НЕК293 (эмбриональные клетки почки человека). Трансфекция клеток НЕК293 проводилась с помощью липофильного реагента по инструкции производителя. Трансфицированные клетки культивировали в течение 5 суток в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 5% CO<sub>2</sub>, 37 °С. Затем отбирали культуральную жидкость, в которой определяли концентрацию антител к C5a анафилотоксину человека с помощью иммуноферментного анализа с моноклональными мышинными антителами против IgG1 человека. Из культуральной жидкости выделяли антитела с помощью аффинной хроматографии на белке А. После определения видоспецифичности антител методом ИФА, установили степень связывания химерного антитела с белком C5a. С помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием антител к IgG человека, иммобилизованных в проточной ячейке прибора, были получены следующие характеристики связывания антитела с белком C5a человека:

- константа ассоциации  $K_a = 2.245 \times 10^8$  1/Мс;
- константа диссоциации  $K_d = 0.01342$  1/с;
- равновесная константа диссоциации  $K_D = 5.976 \times 10^{-11}$  М.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что экспериментальные образцы рекомбинантных химерных антител к C5a компоненту комплемента могут быть использованы для создания специфического гемосорбента или в качестве средства лечения заболеваний, связанных с гиперактивацией комплемента.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Chunguang Yan, Hongwei Gao.* New insights for C5a and C5a receptors in sepsis. *Front Immunol.* 2012, 5, 197.
2. *Aird W.C.* The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood.* 2003, 101, 3765–3777.
3. *Peter A. Ward* Role of C5 Activation Products in Sepsis. *The Scientific World Journal.* 2010, 10, 2395–24022010.

## GENERATION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT ANTIBODY AGAINST THE COMPLEMENT C5a ANAPHYLATOXIN

© 2019 A. A. Vasilishina\*, A. V. Demyanov, V. S. Monahova,  
A. V. Zhakhov, A. V. Trofimov, E. S. Denisenko, K. A. Nekrasova,  
S. V. Rodin, A. S. Simbirtsev, A. M. Ischenko

\*E-mail: a.a.vasilishna@hpb.spb.ru

State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia

Received: 15.03.2019. Accepted: 26.03.2019

Monoclonal mouse antibodies were raised against the human C5a anaphylatoxin. In these antibodies, the light- and heavy-chain constant regions were replaced by human IgG constant regions to produce chimeric mouse–human antibodies.

*Key words:* complement, monoclonal antibodies, human C5a anaphylatoxin

### Authors:

**Vasilishina A. A.**, ✉ MD, Biologist of Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia. E-mail: a.a.vasilishna@hpb.spb.ru;

**Demyanov A. V.**, MD, Head of Laboratory of Immunopharmacology, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

**Monahova V. S.**, Biologist, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

**Zhakhov A. V.**, Leading Researcher, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

**Trofimov A. V.**, Group Leader, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

**Denisenko E. S.**, Project Manager, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

**Nekrasova K. A.**, Deputy Head of R&D Department, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

**Rodin S. V.**, Group Leader, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

**Simbirtsev A. S.**, RAS Corresponding Member, DMedSci, Professor, Scientific Supervisor of State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

**Ischenko A. M.**, PhD, Head of Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia.