

## КОМПЛЕМЕНТ ПРИ ПАТОЛОГИЯХ, ВОЗМОЖНОСТЬ КОРРЕКЦИИ С ПОМОЩЬЮ НОВОГО ГУМАНИЗИРОВАННОГО АНТИТЕЛА, БЛОКИРУЮЩЕГО АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ПУТЬ

© 2019 г. Н. П. Горбунов, А. В. Жахов, А. В. Трофимов,  
К. А. Некрасова, С. В. Родин, Е. А. Аганесян, Е. А. Карабанова,  
М. С. Захаров, А. С. Симбирцев, А. М. Ищенко\*

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

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

Поступила: 15.03.2019. Принята: 27.03.2019

Получены два моноклональных антитела, блокирующих активацию комплемента по альтернативному пути (АП) на этапе сборки и активации C3 конвертазы. Гуманизированное антитело hC34, специфичное сайту связывания на участке  $\alpha'2$  фрагмента C3c, ингибировало активацию комплемента человека на 90% *in vitro* в дозе 3 мкг/мл сыворотки крови. Антитело 3A8, специфичное C3 компоненту комплемента крысы и аналогичное антителу hC34, обладало фармакологической активностью в модели ЗЧМТ, что подтверждалось функциональным и гистологическим исследованием. Полученные результаты указывают на перспективность применения гуманизированного антитела hC34 для лечения патологий центральной нервной системы и других заболеваний с гиперактивацией комплемента.

**Ключевые слова:** комплемент, альтернативный путь активации комплемента, моноклональные антитела, патологии центральной нервной системы

DOI: 10.31857/S102872210006712-8

**Адрес:** 197110. Санкт-Петербург, ул. Пудожская, д. 7, ФГУП «Гос.НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, лаборатория биохимии белка. Ищенко Александр Митофанович. Тел./факс: +7(812) 499 16 61; +7 911 242 34 11 (моб.)

**E-mail:** a.m.ischenko@hpb.spb.ru; n.p.gorbunov@hpb.spb.ru

**Авторы:**

**Горбунов Н. П.**, м. н. с. 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;

**Некрасова К. А.**, зам. 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;

**Аганесян Е. А.**, с. н. с. лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт осо-

бо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Карабанова Е. А.**, инженер 1 категории лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Захаров М. С.**, начальник отдела клинических исследований 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.

Гиперактивация комплемента приводит к накоплению провоспалительных молекул анафилотоксинов C3a, C5a, опсонина C3b и других, которые, становясь источником стерильного воспаления, вносят негативный вклад в развитие множества патологий, связанных с острым и хроническим воспалением.

При неврологических заболеваниях, вовлекающих активацию системы комплемента на поврежденных тканях и клетках мозга, действие комплемента приводит к гибели нейронов, повреждению аксонов, демиелинизации и дисфункции гематоэнцефалического и гемато-спинномозгового барьеров. В этом случае, как и при других иммунологических расстройствах, ингибирование комплемента становится одной из актуальных (ведущих) терапевтических стратегий [1].

Среди различных разрабатываемых ингибиторов моноклональные антитела (МАТ), блокирующие функциональную активность комплемента, представляют повышенный интерес. С учетом сложного характера взаимодействий между компонентами и факторами СК в настоящее время разрабатывается около 20 антител, действующих на различные белки-мишени.

В качестве одного из таких МАТ нами было получено оригинальное гуманизированное антитело hC34 [2], блокирующее активацию комплемента человека по АП на этапе формирования C3-конвертазы.

**Целью** настоящей работы было изучение эпиптопной специфичности антитела hC34, оценка уровня его активности *in vitro*, а также получение его аналога – МАТ мыши, нейтрализующего АПК человека и крысы, и оценка эффективности его действия *in vivo*.

Для определения специфической активности hC34 активацию комплемента по АП проводили инкубацией стандартной сыворотки, содержащей 1 мг/мл компонента C3, с классическим активатором зимозаном в присутствии и в отсутствие антитела. Об уровне активации судили по концентрации полипептида C3a, который является продуктом активации C3. Было установлено, что блокирование активации на 90% достигалось при добавлении в инкубационную смесь 3 мкг hC34.

Изучение специфичности антител hC34 методами иммунохимического анализа (ИФА и иммуноблоттинг) позволило установить, что они распознают неопределяемую C3 компонента, которая формируется при гидролизе тиолэфирной связи и остается фиксированной на молекуле после ее дальнейшей трансформации и деградации в другие производные (C3i, C3b и C3c). Кроме того, в настоящей работе показано, что антитело hC34 и его Fab-фрагмент формируют устойчивый комплекс с фрагментами C3b и C3c и не взаимодействуют с нативным C3. Для поиска фрагмента, несущего сайт связыва-

ния с антителом, изучали белок, адсорбированный на колонке с иммобилизованным hC34, используя методы электрофореза в ПААГ, ВЭЖХ и масс-спектрометрии, и установили, что сайт связывания с антителом локализуется на  $\alpha$ '2-фрагменте C3c молекулярной массой 39 кДа.

С целью исследования эффективности блокирования АПК при патологиях *in vivo* были получены МАТ 3A8 мыши к C3 компоненту комплемента крысы. Антитело по своим свойствам было близко к hC34, т.к. обладало способностью блокировать АПК и крысы, и человека.

Эффективность действия антитела была изучена на модели ЗЧМТ, вызванной у крыс дозированным ударом падающего груза. Эффективность действия антитела оценивали по массовому коэффициенту головного мозга, отражающему интенсивность воспалительной реакции в ответ на повреждение, сопровождающейся отеком; по когнитивной функции экспериментальных животных в тесте условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) с использованием аппаратно-программного комплекса «Шелтер» (ООО «Нейроботикс», Россия), а также путем гистологического исследования отделов головного мозга.

Показано, что применение антитела 3A8 сопряжено с дозозависимым снижением массовых коэффициентов мозга животных, получавших изучаемое антитело на фоне черепно-мозговой травмы, до уровня данного показателя у интактных животных.

Анализ сохранности УРПИ (интерпретируемой как сохранение когнитивных функций экспериментальных животных) показал, что в обеих экспериментальных группах, получавших изучаемый препарат, сохранность рефлекса составила 100%, что было на 30% выше, чем в группе контрольных животных, получавших ЗЧМТ, и указывало на четкую тенденцию к сохранению памятного следа у животных экспериментальных групп.

Гистологический анализ показал, что после травмы у животных наблюдали периваскулярные кровоизлияния и инфильтрацию лейкоцитами, вазоспазм, отек, полнокровие сосудов. У животных опытных групп, получавших препарат в дозах 125 и 250 мг/кг, было выявлено лишь небольшое полнокровие сосудов и очаги отека ткани. Помимо этого в ряде случаев у животных контрольной группы наблюдали очаговые кровоизлияния в толще мозговых оболочек; у животных опытных групп состояние мозговых оболочек было нормальным. Кроме того, гистологический анализ показал, что введение пре-

парата снизило выраженность картины ЗЧМТ, а также достоверно и дозозависимо снизило процент погибших нейронов в гипоталамусе.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что блокирование компонента по АП с помощью полученных нейтрализующих антител приводит к положительному терапевтическому эффекту, что позволяет рассматривать гуманизированные антитела hC34 в качестве инновационного терапевтического средства для лечения патологий ЦНС и других патологий, связанных с неконтролируемой активацией компонента.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Ricklin D., Mastellos D. C., Reis E. S., Lambris J. D. The renaissance of complement therapeutics. *Nat Rev Nephrol.* 2018 Jan, 14(1), 26–47.
2. Пат. РФ № 2630647: C07K 16/18, C12N15/00, A61K 39/395 / Картузова В. Е., Трофимов А. В., Ищенко А. М., Родин С. В., Жахов А. В., Симбирцев А. С., Климов Н. А., Петров А. В., Карасев М. М. – заявка 2016120997; опубли. 11.09.2017, Бюл. № 26 [Pat. 2630647 Russian Federation: C07K 16/18, C12N15/00, A61K 39/395 / Kartuzova V. E., Trofimov A. V., Ischenko A. M., Rodin S. V., Zhahov A. V., Simbirtsev A. S., Klimov N. A., Petrov A. V., Karasev M. M. – Application 2016120997; Publ. 11.09.2017, Bul. № 26].

## COMPLEMENT IN PATHOLOGIES, POSSIBILITY OF CORRECTION USING A NOVEL HUMANIZED ANTIBODY THAT CAN BLOCK ALTERNATIVE PATHWAY OF COMPLEMENT SYSTEM ACTIVATION

© 2019 N. P. Gorbunov, A. V. Zhakhov, A. V. Trofimov, K. A. Nekrasova, S. V. Rodin, E. A. Atanesyan, E. A. Karabanova, M. S. Zakharov, A. S. Simbirtsev, A. M. Ischenko\*

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

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

Received: 15.03.2019. Accepted: 27.03.2019

Two monoclonal antibodies were developed and were shown to block the complement system alternative pathway (AP) activation at the stage of assembly and activation of C3 convertase. The humanized antibody hC34 specific to a binding site on  $\alpha'2$  determinant of C3c fragment inhibited *in vitro* the human complement activation by 90% at a dose of 3  $\mu\text{g/ml}$  of blood serum. The antibody 3A8 specific to rat complement C3 component and similar to antibody hC34 was demonstrated to be pharmacologically active in model of closed craniocerebral injury (data of functional and histological studies). The results of this study indicate the humanized antibody hc34 to be promising for treatment of central nervous system pathologies and of other diseases associated with complement hyperactivation.

*Key words:* complement, alternative pathway of complement system activation, monoclonal antibodies, central nervous system pathologies

### Authors:

**Gorbunov N. P.**, Junior Researcher, 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;

**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;

**Atanesyan E. A.**, Senior Researcher, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

**Karabanova E. A.**, Engineer, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

**Zakharov M. S.**, Head of Department of Preclinical Studies, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

**Simbirtsev A. S.**, RAS Corresponding Member, MD, 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. E-mail: a.m.ischenko@hpb.spb.ru