

ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ С ЦЕЛЬЮ ИММУНОАФФИННОЙ ОЧИСТКИ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ И СОЗДАНИЯ ПРОТОТИПА ГЕМОСОРБЕНТА

© 2019 г. Н. П. Горбунов^{1,2}, В. А. Костевич¹, А. В. Соколов^{1*}

*E-mail: biochemsokolov@gmail.com

¹ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия;

²ФГУП «Гос. НИИ Особо Чистых Биопрепаратов» ФМБА России,
Санкт-Петербург, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 01.04.2019

Миелопероксидаза (МПО) является перспективной мишенью для противовоспалительной терапии и профилактики развития атеросклероза. Известно, что МПО является независимым предиктором осложнений сердечнососудистых патологий, в том числе повторного инфаркта миокарда. С целью разработки иммуноферментного анализа нами были получены моноклональные антитела против МПО (клон 2F7), которые по результатам анализа с помощью поверхностного плазмонного резонанса взаимодействовали с МПО по электростатическому принципу. Оказалось, что при иммобилизации антител на бромциан-активированную агарозу полученный сорбент селективно связывал МПО при 0,15 М NaCl. Элюция МПО обеспечивалась 1 М NaCl (рН 7,4), что не нарушало протетическую гемовую группировку. При анализе сорбции МПО из образцов плазмы крови была определена константа диссоциации около 0,07 нМ. Учитывая, что патологическая концентрация МПО превышает 0,15 нМ полученный сорбент, может быть прототипом гемосорбента для МПО.

Ключевые слова: миелопероксидаза, моноклональные антитела, гемосорбент, сердечнососудистые патологии, воспаление, аффинная хроматография

DOI: 10.31857/S102872210006464-5

Адрес: 197376 Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Отдел молекулярной генетики. Соколов Алексей Викторович. Тел./факс: +7 (812) 2345606, +7911 9670594 (моб.).

E-mail: biochemsokolov@gmail.com

Авторы:

Горбунов Н. П., аспирант, Отдел молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия; м.н.с. ФГУП «Гос. НИИ Особо Чистых Биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Костевич В. А., к.б.н., старший научный сотрудник Отдела молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия;

Соколов А. В., д.б.н., заведующий лабораторией Отдела молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия.

Миелопероксидаза (МПО) относится к семейству гем-содержащих пероксидаз млекопитающих и является самым мажорным представителем ферментов данной группы в организме человека. Уникальным свойством МПО считается способность катализировать продукцию

НОС1, что обеспечивает антимикробный потенциал нейтрофилов. При воспалении концентрация МПО в плазме крови увеличивается с 0,15 нМ до 10 нМ, при этом в ряде многоцентровых исследований было показано, что увеличение концентрации МПО является предиктором развития осложнений при сердечно-сосудистых заболеваниях, в том числе инфаркта миокарда [1]. Учитывая, что МПО вовлечена не только в антимикробную защиту организма, но и способна повреждать макромолекулы организма при хроническом воспалении и ассоциированными с ним патологиями [1], представляется перспективным оценивать концентрацию МПО, её активность и, в перспективе, разработать способ для её специфической элиминации из кровотока. Для решения обозначенной выше цели необходимо было получить специфические антитела против МПО и охарактеризовать их аффинность с целью практического применения.

Из линии клеток HL-60 (промиелоцитарная лейкемия) с помощью хроматографических методов нами был выделен гомогенный препарат МПО. С помощью иммунизации мышей и гибридной технологии было получено несколько клонов, продуцирующих антитела против МПО. С помощью иммуноферментного анализа была изучена способность антител сорбировать МПО по электростатическому принципу, т.е. при повышении ионной силы раствора происходило разобщение комплекса МПО с антителами. В результате был отобран клон 2F7, проведено масштабирование процесса получения антител и их очистка из асцитной жидкости мышей. Полученные антитела изучали на предмет аффинности к МПО с помощью поверхностного плазмонного резонанса, а также иммобилизовали их на бромциан-активированном агарозном геле для получения иммуноаффинного сорбента для очистки МПО либо ее элиминации из раствора.

С помощью прибора Biacore X-100 на чип CM5 с иммобилизованной МПО наносили различные концентрации антител и проводили их десорбцию раствором 1 М NaCl (10 мМ Нерес-NaOH, pH 7,4). Было доказано, что при нанесении 1 М NaCl происходит полная десорбция моноклональных антител против МПО с поверхности сенсора, но после уравнивания 0,15 М NaCl связанная с поверхностью сенсора МПО вновь сорбировала антитела.

С помощью метода бромциановой активации был синтезирован агарозный гель с иммобилизованными антителами 2F7 (12 мг на 1 мл влажного геля). Такой сорбент связывал около 8 мг МПО на 1 мл влажного геля при элюции 150 мМ NaCl. Увеличение ионной силы раствора до 1 М NaCl позволяло элюировать гомогенную МПО с неповрежденной простетической группой. Процедуру очистки МПО повторяли три раза, при этом свойства сорбента практически не из-

менялись. При хроматографии на колонке с 5 мл сорбента 2F7-агароза 3 литров среды, полученной при выращивании культуры секретирующих МПО клеток HL-60, было получено 14 мг МПО, которая составляла лишь 0,08% от общего белка в среде, с выходом более 96%.

При иммобилизации антител 2F7 на твердой фазе полистирольного планшета в его лунках можно было сорбировать МПО, как очищенную, так и из образцов плазмы крови, а затем выявлять ее активность с помощью флуорогенного субстрата, окисляющегося HOBr, образование которой катализировала МПО, связанная с антителами на твердой фазе. Данный подход позволил проанализировать активность МПО в образцах плазмы крови здоровых доноров и пациентов с различными воспалительными патологиями. Результаты анализа показали высокую степень корреляции ($r=0.87$) с результатами традиционного иммуноферментного анализа на МПО, исполнение которого занимало в 2 раза больше времени.

Был проведен анализ элиминации с помощью 2F7-агарозы МПО, внесенной в диапазоне концентраций от 0,02 до 3 нМ в сыворотку крови доноров. Результаты измерения свободной МПО после уравнивания системы позволили определить по графику в координатах Скэтчарда константу диссоциации комплекса МПО-2F7 как 0,07 нМ.

Работа поддержана грантом Президента РФ МД-5133.2018.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Панасенко О. М., Горудко И. В., Соколов А. В. Хлорноватистая кислота как предшественник свободных радикалов в живых системах // Успехи биологической химии, 2013, 53, 195–244. [Panashenko O. M., Gorudko I. V., Sokolov A. V. Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems. Biochemistry (Moscow). 2013, 78(13), 1466–1489].

OBTAINING OF MONOCLONAL ANTIBODY FOR IMMUNOAFFINITY PURIFICATION OF MYELOPEROXIDASE AND PROTOTYPE OF HEMOSORBENT

© 2019 N. P. Gorbunov^{1,2}, V. A. Kostevich¹, A. V. Sokolov^{1*}

*E-mail: biochemsokolov@gmail.com

¹Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia;

²State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, FMBA of Russia,
Saint Petersburg, Russia

Received: 15.03.2019. Accepted: 01.04.2019

Myeloperoxidase (MPO) is a promising target for anti-inflammatory therapy and prevention of atherosclerosis. It is known that MPO is an independent predictor of complications of cardiovascular pathologies, including secondary myocardial infarction. For developing an enzyme-linked immunoassay, we obtained monoclonal antibodies against MPO (clone 2F7), which, interacted with MPO according to the electrostatic principle according to the results of surface plasmon resonance analysis. When antibodies were immobilized on cyanogen bromide-activated agarose, the resulting sorbent selectively bound MPO at 0.15 M NaCl. The elution of MPO was provided by 1 M NaCl (pH 7.4), which did not disrupt the properties of the prosthetic heme group. When analyzing the sorption of MPO from plasma samples, the dissociation constant about 0.07 nM was determined. Given that the pathological concentration of MPO exceeds 0.15 nM, the resulting sorbent can be a prototype of a hemosorbent for MPO.

Key words: myeloperoxidase, monoclonal antibody, hemosorbent, cardiovascular pathologies, inflammation, affinity chromatography

Authors:

Gorbunov N. P., PhD Student, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia; Junior Researcher, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, FMBA of Russia, Saint Petersburg, Russia;

Kostevich V. A., PhD, Senior Researcher, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia;

Sokolov A. V., ✉ Doctor of Biological Sciences, Head of laboratory, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia.

E-mail: biochemsokolov@gmail.com