

РАЗРАБОТКА ИММУНОСОРБЕНТА ДЛЯ УДАЛЕНИЯ АНАФИЛАТОКСИНА C5a ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ПАТОЛОГИЯМИ, СВЯЗАННЫМИ С ГИПЕРАКТИВАЦИЕЙ КОМПЛЕМЕНТА

© 2018 г. Е. С. Денисенко*, А. В. Жахов, Н. П. Горбунов, А. В. Трофимов, А. М. Ищенко

*E-mail: denisenko@hpb-spb.com

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

Активированный комплемент вносит существенный вклад в патологическое развитие воспаления. Анафилаксин C5a обладает мощным провоспалительным потенциалом и, в случае избытка, является крайне неблагоприятным фактором для течения патологического процесса. Оптимальным способом удаления анафилаксина является специфическая гемосорбция. В работе получены гибридомы, продуцирующие три типа моноклональных антител (МАТ) к C5a: AC5a-2, AC5a-7 и AC5a-11. Свойства антител охарактеризованы методами иммунохимического анализа, электрофореза и поверхностного плазмонного резонанса. Показано, что антитела обладают различной эпитопной специфичностью, относятся к изотипу IgG1 и характеризуются различными константами взаимодействия с C5a. Синтезированы три партии иммуносорбента, которые исследованы в экспериментах по удалению C5a из модельного раствора плазмы крови. По результатам исследования МАТ AC5a-2 были выбраны в качестве кандидатных для создания гемосорбентов на их основе.

Ключевые слова: гемосорбент, анафилаксин C5a, моноклональные антитела, система комплемента

DOI: 10.31857/S102872210002629-6

Авторы:

Денисенко Е. С., инженер лаборатории биохимии белка ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Жахов А. В., в.н.с. лаборатории биохимии белка ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Горбунов Н. П., м.н.с. лаборатории биохимии белка ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Трофимов А. В., руководитель группы лаборатории биохимии белка ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Ищенко А. М., к.б.н., начальник лаборатории биохимии белка ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

Введение. В результате активации системы комплемента образуется значительное количество биологически активных фрагментов, включая анафилаксин C3a, C4a, C5a, которые играют важную роль в развитии воспалительных реакций за счет активации тучных клеток, эозинофилов и нейтрофилов. В результате различных нарушений в организме, включая генетические дефициты регуляторных белков комплемента, аутоиммунные заболевания, инфаркты, травмы, трансплантацию органов и тканей, сепсис, об-

разуется избыточное количество анафилаксина. Это приводит к более тяжелому течению патологического процесса [1]. Наиболее опасной является гиперпродукция C5a, который обладает мощным провоспалительным потенциалом, а при сепсисе является крайне неблагоприятным фактором, порой критическим для летального исхода [2]. Таргетное блокирование C5a является актуальной терапевтической стратегией при лечении острого системного воспалительного синдрома и септического шока, причем наиболее эффективным подходом является гемосорбция с использованием иммобилизованных на сорбенте рекомбинантных антител к C5 компоненту комплемента.

В связи с этим **целью работы** было получение моноклональных антител, их характеристика и выбор оптимального антитела для синтеза гемосорбентов для специфического удаления C5a из крови больных с тяжелыми патологиями.

Материалы и методы. Анафилаксин C5a получали из активированной сыворотки крови доноров. Активацию проводили инкубацией сыворотки крови с обработанными пекарскими

дрожжами в присутствии хлорида магния (10 мМ) (GE Healthcare, США) и специфического ингибитора карбоксипептидазы-Б (MERGEPTA) (0,1 нМ) (Sigma, США). После остановки реакции добавлением этилендиаминтетрауксусной кислоты (GE Healthcare, США) и ингибитора сериновых протеаз фенолметилсульфонилфторида (GE Healthcare, США) (20 мМ и 0,5 мМ соответственно) С5а выделяли иммуноаффинной хроматографией на колонке с коммерческим иммуносорбентом анти С5а-Сефароза (Beringer, Германия). После десорбции С5а с иммуносорбента 0,1 М глицин-НСI буферным раствором, рН 2,2 (GE Healthcare, США) элюат дополнительно очищали гель-фильтрацией на колонке TSK G-2000SW 21.5x600 mm (Sigma, США) в режиме ВЭЖХ. Чистоту препаратов проверяли электрофорезом по Лэммли в градиенте полиакриламидного геля 15–25%.

МАТ получали, используя классический метод гибридной технологии. Линейных мышей Balb/c (питомник лабораторных животных Рапполово) иммунизировали однократно очищенным С5а в полном адьюванте Фрейнда (Sigma, США) дозами 5–10 мкг и затем бустировали теми же дозами внутривенно. Первичный скрининг гибридом, продуцирующих МАТ, осуществляли методом твердофазного ИФА. Эпитопную специфичность оценивали в конкурентном ИФА. Нарботку МАТ из отобранных клонов осуществляли в мышинных асцитах, используя пристан (GE Healthcare, США) для роста асцитов. IgG фракцию полученных МАТ выделяли хроматографией на сорбенте Белок А-сефароза. Изотипирование полученных МАТ осуществляли с использованием набора ISO-2 (Sigma, США).

С целью детальной характеристики полученных МАТ измеряли параметры их взаимодействия с С5а, включая константы диссоциации и ассоциации. Измерения проводили с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса с использованием чипов с карбоксиметилированным декстраном (СМ5) (GE Healthcare, США) на приборе Biacore X100 с двойной проточной ячейкой (GE Healthcare, США).

Для оценки аффинности возрастающие концентрации анализата (С5а) инъецировали над чипом после сорбции МАТ к С5а. Равновесная константа диссоциации K_D комплекса МАТ-С5а была определена по зависимости установившегося значения от концентрации С5а. Определялась также величина R_{max} — макси-

мальная связывающая способность поверхности чипа, с иммобилизованными МАТ.

Для дальнейших исследований полученные МАТ иммобилизовали на CNBr-активированную Сефарозу-4 FF (GE Healthcare, США), получив три партии иммуносорбентов, обозначенных как ИС-(АС5а-2), ИС-(АС5а-7), ИС-(АС5а-11).

Результаты. Полученный белок С5а имел характерную молекулярную массу около 10 кДа и был в высокой степени гомогенен.

В результате скрининга были отобраны гибридомы, продуцирующие три типа МАТ к С5а, которые обладали различной эпитопной специфичностью и были обозначены АС5а-2, АС5а-7 и АС5а-11 и, по данным изотипирования, относились к субклассу IgG1.

Все три типа МАТ по параметрам взаимодействия с С5а значительно отличались друг от друга. МАТ АС5а-2 по сравнению с двумя другими типами характеризовались наибольшей константой ассоциации $K_a=83,95$ 1/Мс, наименьшим значением равновесной константы диссоциации $K_D=5,69 \times 10^{-9}$ М и средней величиной кинетической константы диссоциации $K_d=0,477$ 1/с, что указывало на их наибольшую аффинность по отношению к С5а. МАТ АС5а-11 в этом ряду сравнения имели самое большое значение R_{max} , и, следовательно, обладали способностью адсорбировать наибольшее количество антигена. Кроме того, МАТ АС5а-11 характеризовались наименьшим значением $K_d=0,0027$ 1/с, что свидетельствовало о том, что они обладают свойством связывать антиген необратимо. Результаты исследования показали, что МАТ АС5а-7 обладали худшими среди двух других параметрами взаимодействия с антигеном.

Для оценки емкости объемами 0,2 мл каждый из иммуносорбентов ИС-(АС5а-2), ИС-(АС5а-7), ИС-(АС5а-11) помещали в хроматографические колонки размером 5x10 мм, через которые пропускали 150 мл плазмы, содержащей С5а с концентрацией 1,5 мкг/мл в режиме непрерывного цикла в течение 16 ч. Адсорбированный С5а элюировали с колонки буферным раствором, рН 2,5, (Sigma, США) и с помощью ИФА определяли количество адсорбированного белка. Емкость у всех сорбентов была приблизительно одинаковой и равной 110 мкг.

Для оценки эффективности действия иммуносорбентов через каждую их тех же колонок пропускали по 120 мл плазмы крови с установленной концентрацией С5а — 550 нг/мл. Хрома-

тографию вели со скоростью 0,5 мл/мин в течение 6 часов, отбирая пробы для определения остаточного уровня C5a через каждые 10 мл. Последнюю пробу отбирали после нанесения всего объема сыворотки (120 мл). Концентрацию C5a в пробах определяли методом ИФА.

Результаты показали, что все три исследованных сорбента обладали способностью эффективно удалять C5a из модельного раствора. При этом наибольшей эффективностью обладал иммуносорбент ИС-(АС5а-2) с иммобилизованными антителами АС5а-2, с помощью которого в условиях модельного эксперимента уже через 20 минут можно было удалить около 90% C5a. При этом сорбент не снижал эффективности при продолжении нагрузки вплоть до прохождения 70 мл модельной плазмы крови или 38,5 мкг C5a. Этот результат по эффективности действия АС5а-2 находится в согласии с дан-

ными исследованиями по взаимодействию МАТ с C5a, выполненного методом поверхностного плазмонного резонанса.

Исследование выполнено в рамках государственного контракта с ФМБА России по теме: «Разработка нового поколения высокоэффективных гемосорбентов на основе иммобилизованных рекомбинантных моноклональных антител для лечения синдрома системного воспалительного ответа».

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.

DEVELOPMENT OF IMMUNOADSORBENT FOR C5a ANAPHYLATOXIN ELIMINATION FROM BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH COMPLEMENT HYPERACTIVATION-ASSOCIATED PATHOLOGIES

© 2018 E. S. Denisenko*, A. V. Zakhov, N. P. Gorbunov, A. V. Trofimov, A. M. Ischenko

*E-mail: denisenko@hpb-spb.com

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

The activation of complement can significantly contribute to pathologic inflammation development. C5a anaphylatoxin is a potent inflammatory mediator and when excessively produced, can be extremely unfavorable for pathological process. Specific hemosorption is the most suitable method for anaphylatoxin elimination. Three types of monoclonal antibodies (MAbs) against C5a anaphylatoxin—AC5a-2, AC5a-7 и AC5a-11 were generated for this study using hybridoma technologies. These antibodies were characterized by immunoassay, by electrophoresis and surface plasmon resonance techniques. MAbs analysis demonstrated that antibodies were of different epitope specificities and different affinity constants for C5a and were of IG1 isotype. Three batches of the immunosorbents were synthesized and evaluated for C5a elimination from a model blood plasma solution. As a result the AC5a-2 MAbs were selected as candidate antibodies for the development of hemosorbents.

Key words: hemosorbent, C5a anaphylatoxin, monoclonal antibodies, complement system

Authors:

Denisenko E. S., ✉ Engineer, Laboratory of Protein Biochemistry State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia; E-mail: denisenko@hpb-spb.com;

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

Gorbunov N. P., Senior 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;

Ischenko A. M., Ph.D., Head of Laboratory of Protein Biochemistry State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg.