

ПРИМЕНЕНИЕ ЛЕКТИНОВ ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГЛИКАНОВ В СОСТАВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ

©2018 г. В. С. Монахова*, М. Е. Сушкин, Н. В. Пигарева,
А. С. Симбирцев

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

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

Гликозилирование является наиболее распространенной посттрансляционной модификацией белков. Гликаны в составе рекомбинантных антител и цитокинов определяют их свойства, такие как биологическая активность, стабильность молекулы, время циркуляции в организме. Поэтому анализ гликанов является одной из важнейших характеристик препарата. Лектины – это белки, специфично связывающиеся с сахарами и гликанами – отдельными цепочками сахаров, в составе гликопротеинов. Целью данного исследования являлась разработка метода иммуноферментного твердофазного лектинового анализа для характеристики гликанов. В ходе экспериментов были определены условия анализа гликопротеинов в очищенном виде и в супернатантах, подобран блокирующий агент и времена инкубации с лектинами и антителами для уменьшения фонового сигнала. В результате лектиновый анализ может быть использован в качестве одного из методов оценки состава гликанов в белковых препаратах.

Ключевые слова: гликопротеины, лектины, лектиновый анализ, иммуноферментный твердофазный анализ

DOI: 10.31857/S102872210002646-5

Адрес: 197110 Санкт-Петербург, ул. Пудожская, д. 7,
ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, лаборатория иммунофармакологии, Монахова Варвара Сергеевна.
Тел./факс: +7(812) 2351225, +79816801960 (моб.).

E-mail: monakhova@hpb-spb.com

Авторы:

Монахова В. С., младший научный сотрудник лаборатории иммунофармакологии ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Сушкин М. Е., старший лаборант лаборатории иммунофармакологии ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Пигарева Н. В., к.б.н., в.н.с. лаборатории иммунофармакологии ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Симбирцев А. С., д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, научный руководитель ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Введение. Анализ гликанов в составе рекомбинантных терапевтических белков требует комплексного подхода, поскольку в настоящее время не существует единого метода для полной характеристики гликопротеинов: состава сахаров, количества сайтов гликозилирования, процентного соотношения отдельных моносахаридов. Кроме того, используемые методы, такие как масс-спектрометрия и капиллярный

электрофорез, требуют наличия дорогостоящего оборудования и длительной процедуры пробоподготовки. При этом использование иммуноферментного твердофазного лектинового анализа не требует значительных финансовых затрат и времени [1].

Лектины – это белки, которые способны распознавать сахара на поверхности гликопротеинов и других биомолекул [2]. Взаимодействие лектинов с углеводами открывает перспективы их применения в таких областях, как иммунология, онкология и медицина, для диагностики и терапии различных заболеваний [3]. В последние годы лектины используют в составе тест-систем на основе микрочипов, позволяющих быстро оценить гликановый профиль белка [4, 5, 6]. В настоящем исследовании описаны основные подходы к созданию тест-системы в формате стандартного твердофазного иммуноферментного анализа. Также отмечены примеры использования данного метода для различных задач – экспресс-анализ отдельных сахаров в составе гликопротеинов и подробная характеристика гликанового профиля белка.

Материалы. 96-луночные планшеты для максимальной сорбции белка (Nunc), наборы био-

тинилованных лектинов Biotinylated lectin kits I, II, III (Vector Labs), бычий сывороточный альбумин (Росмедбио), поливиниловый спирт (Sigma Aldrich), антитела к человеческому интерлейкину-7 (Biolegend), стрептавидин пероксидаза (Calbiochem), твин 20 (Росмедбио), трис (Sigma Aldrich), хлорид натрия (Вектон), соляная кислота (НеваРеактив), натрий-фосфатный буфер (Росмедбио).

Образцы для анализа. Образцы субстанций химерного гликозилированного белка, содержащего рецептор фактора некроза опухоли человека; культуральная жидкость, содержащая рекомбинантный интерлейкин-7 человека; субстанция рекомбинантного интерлейкина-7 человека.

Методы. Иммуноферментный анализ осуществляли в 96-луночных планшетах с повышенной сорбцией белка. Разведение белковых растворов осуществляли в натрий-фосфатном буферном растворе, первичную инкубацию антител или других белков в лунках проводили при температуре 4 °С в течение 15 ч и при комнатной температуре в течение 2 ч. Для промывки лунок после инкубаций использовали трис-буферный раствор, содержащий 0,05% твина-20. В качестве блокирующего буферного раствора использовали 3% раствор бычьего сывороточного альбумина или 5% раствор поливинилового спирта в трис-буфере. Биотинилированные лектины растворяли в натрий-фосфатном буферном растворе. Стрептавидин пероксидазу инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре Victor2 (Wallac) при длине волны 450 нм.

Результаты

1. Подбор оптимальных условий для проведения анализа. Использование раствора поливинилового спирта по сравнению с раствором бычьего сывороточного альбумина позволило снизить уровень фонового значения на 30%. Оптимальная концентрация биотинилированных лектинов составила 5 мкг/мл.

2. Определение состава гликанов в очищенных образцах белка и культуральной жидкости. Для анализа десиалированных форм интерлейкина-7 был использован лектин ECA (Erythrina Cristagally), который связывается с концевыми остатками галактозы в составе гликана [7]. Специфичность лектина была показана в случае использования образцов очищенного белка и при использовании культуральной жидкости, содержащей рекомбинантный белок.

3. Использование твердофазного иммуноферментного анализа для полной характеристики состава гликанов. Для оценки гликанового профиля использовали образцы химерного белка, содержащего рецептор фактора некроза опухоли человека. В составе гликопротеинов детектировали наличие бисекционного N-глюкозамина, наличие сиаловых кислот и концевой галактозы, коровой фукозы, а также комплексных N-гликанов. Партии субстанции белка, отличающиеся по биологической активности, имели различное содержание неветвистых O-гликанов.

Выводы. Вследствие сложности процесса гликозилирования и возможности образования спектра гликановых структур процесс разработки анализа терапевтических гликопротеинов является сложным [8]. Данное исследование позволяет доказать, что иммуноферментный твердофазный анализ является эффективным методом анализа гликанов. В дальнейшем планируется использовать метод для оценки гликанового профиля терапевтических рекомбинантных антител.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Landemarre L., Duverger E. Lectin glycoprofiling of recombinant therapeutic interleukin-7. In the book: Glycosylation engineering of biopharmaceuticals: Methods and protocols. Humana Press, 2013; 221–26.
2. Hyoung J. K., Seung J. L., Kim H.-J. Antibody-based enzyme-linked lectin assay (ABELLA) for the sialylated recombinant human erythropoietin present in cell culture supernatant. Journal of Pharmaceutical and biomedical analysis. 2008, 48, 716–721.
3. Павловская Н.Е., Гагарина И.Н. Функциональная роль лектинов растений как предпосылка для их применения в биотехнологии. Химия растительного сырья. 2017, 1, 21–35. [Pavlovskaya N. E., Gagarina I. N. Functional role of plant lectins as a premise for its application in biotechnology. Chemistry of vegetable raw materials. 2017, 1, 21–35]
4. Wu J., Zhu J., Yin H., Buckanovich R. J., Lubman D. M. Analysis of glycan variation on glycoproteins from serum by the reverse lectin-based ELISA assay. Journal of proteome research. 2014, 13, 2197–2204.
5. Thompson R., Creavin A., O'Connell M., O'Connor B., Clarke P. Optimization of the enzyme-linked lectin assay for enhanced glycoprotein and glycoconjugate analysis. Analytical Biochemistry. 2011, 413, 114–122.
6. Gornik O., Lauc G. Enzyme linked lectin assay (ELLA) for direct analysis of transferrin sialylation in serum samples. Clinical Biochemistry. 2007, 40, 718–723.
7. Zhang L., Luo S., Zhang B. The use of lectin microarray for assessing glycosylation of therapeutic proteins. Mabs. 2016, 8 (3), 524–535.
8. Weber A., Minibek E., Scheiflinger F., Turecek P. L. Development of a lectin binding assay to differenti-

ate between recombinant and endogenous proteins in pharmacokinetics studies of protein-biopharmaceuti-

icals. Journal of pharmaceuticals and biomedical analysis. 2015, 108, 21–28.

USE OF LECTINS FOR ANALYSIS OF GLYCANS IN RECOMBINANT PROTEIN BIOPHARMACEUTICALS

© 2018 V. S. Monakhova*, M. E. Sushkin, N. V. Pigareva, A. S. Simbirtsev

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

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

Glycosylation is one of the most diverse post-translation modifications of proteins. Glycans inserted in recombinant antibodies and cytokines determine their properties such as biological activity, molecular stability and circulation time. Therefore, glycan analysis is one of the most important characteristics of biopharmaceuticals. Lectins are proteins, which specifically bind to sugars and glycans – the sugar chains in glycoproteins. The aim of this study was to develop an enzyme-linked lectin assay for glycan analysis. During the experiments, the conditions of analysis for purified and crude glycoprotein samples were determined, a blocking agent and time of incubation with lectins and antibodies were chosen to reduce high background. As a result, lectin assay is applicable for identification of glycans in protein biopharmaceuticals.

Key words: glycoproteins, lectins, lectin analysis, enzyme-linked assay

Authors:

Monakhova V. S., ✉ Junior Researcher, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia; E-mail: monakhova@hpb-spb.com;

Sushkin M. E., Senior Assistant, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

Pigareva N. V., Ph.D., Leading Researcher, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

Simbirtsev A. S., DrSci, Professor, Associate Member of RAS, Institute Research Advisor, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia.

АУТОАНТИТЕЛА У БОЛЬНЫХ САРКОИДОЗОМ ЛЕГКИХ

©2018 г. О. В. Москалец

E-mail: 6816000@mail.ru

ГБУЗ МО Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского, Москва, Россия

В статье представлены данные пилотного исследования по оценке уровня антител к двуспиральной ДНК (анти-дсДНК) и антинейтрофильных антител (АНФА) у 40 больных саркоидозом легких и 48 больных с легочными диссеминациями другой этиологии. АНФА были выявлены у 19 (56%) больных саркоидозом и 25 (52,5%) больных контрольной группы; анти-дсДНК, соответственно, у 13 (32,5%) и 17 (35,4%) больных. Чаще всего аутоантитела выявлялись у больных саркоидозом с продолжительностью заболевания от 1 до 5 лет (91%). Корреляций с особенностями клинических проявлений или рентгенологической картиной не выявлено.

Ключевые слова: саркоидоз, легочная диссеминация, аутоантитела

DOI: 10.31857/S102872210002647-6

Авторы:

Москалец О. В., к.м.н., в.н.с. научно-исследовательской лаборатории ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского», Москва, Россия.

Введение. За последние десятилетия изучение патогенеза поражения легких при саркоидозе

позволило существенно расширить представления о механизмах развития гранулематозного воспаления и формировании фиброзных поствоспалительных изменений в легочной ткани [1]. Проведенные исследования показали, что процесс фиброобразования определяется персистирующими воспалительными стимула-