СИНТЕЗ ТА АНАЛІЗ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН

Рекомендована д.х.н., професором В.В.Болотовим

УДК 57.083.2+578.74

СИНТЕЗ ТА БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ, АЦИЛЬОВАНИХ ЯНТАРНИМ АНГІДРИДОМ

А.В.Мартинов, В.П.Черних

Національна фармацевтична академія України

Наведені дані про результати дослідження біологічних властивостей імуноглобулінів, ацильованих янтарним ангідридом. Метою дослідження було встановлення оптимального ступеня ацилювання імуноглобулінів, при якому їх специфічність зростає та зберігається здатність зв'язувати комплемент. Встановлено, що повне ацилювання всіх вільних аміногруп антитіл призводить до втрати ними специфічності та здатності до активації комплементу. Ацилювання 5-10% аміногруп збільшує на порядок їх чутливість та залишає фактично незмінною їх здатність до активації комплементу. Також показано, що ацильовані імуноглобуліни з різним ступенем ацилювання повністю втрачають здатність викликати аглютинацію еритроцитів та зв'язувати комплемент після їх обробки трипсином, тобто їх стабільність до протеолізу після ацилювання не збільшується.

Імуноглобуліни (ІГ) є основним компонентом гуморального імунітету та захищають вищі організми від зовнішніх генетично чужорідних факторів. Основною функцією імуноглобулінів є зв'язування у нерозчинні конгломерати генетично чужорідних факторів (клітин, вірусів, білків, інших речовин) з поступовим руйнуванням цих комплексів завдяки системі комплементу, пропердину, активації імуноцитів [1].

У фармацевтичній та медичній галузях ІГ широко використовуються як для діагностики різних захворювань (в імуноферментному аналізі, методі флюоресцюючих ІГ та ін.), так і для лікування (моноклональні ІГ проти деяких ракових пухлин, проти цитомегаловірусу, нормальний людський імуноглобулін, донорські протигрипозні ІГ та ін.) [2]. Основним недоліком лікувальних імуноглобулінових препаратів є їх висока алергенність. Завдяки останній довготривале використання імуноглобулінів неможливе часто супроводжується небажаними алергічними реакціями. Крім того, алергенність препаратів ІГ спонукає використовувати виключно донорські та моноклональні ІГ, що дуже дорого та невигідно.

Основними характеристиками ІГ, які підтверджують їх якість, є специфічність, стабільність до протеолізу, здатність активувати комплемент [3]. Чи, можливо, завдяки хімічній модифікації збільшити чутливість та специфічність імуноглобулінів, а також збільшити їх стабільність до протеолізу та залишити незмінною їх властивість активувати комплемент, є посилання на модифіковані негативно заряджені імуноглобуліни, де підтверджується значне збільшення чутливості ІГ до антигена-мішені (АГ), але інші характеристики ІГ досліджені не були [6].

Також відомо, що ацильовані білки фактично не алергенні, тобто вони не викликають імунних реакцій та анафілактичного шоку [5]. Розробка технології, яка б дозволила зробити чужорідні імуноглобуліни неалергенними, високочутливими до антигена мішені, здатними зв'язувати комплемент, призвела б до нового прориву у створенні цілого класу напівсинтетичних імуноглобулінових препаратів.

Метою дослідження було встановлення оптимального ступеня ацилювання (СА) моноклональних імуноглобулінів класу G (IgG) шляхом дослідження кореляції між СА ІГ та рівнем специфічності, стабільності до протеолізу і здатності ІГ зв'язувати комплемент.

Матеріали та методи

Для ацилювання імуноглобулінів використовували янтарний ангідрид Fluka, готовий фосфатний буфер для біологічних досліджень фірми "Aldrich-Sigma", імуноглобуліни нормальні фірми "Біолік", імуноглобуліни проти важких ланцюгів IgG людини та комплемент "Одеського заводу бакпрепаратів", сефарозу G-50 (Farmacia) для

Таблиця

Досліджені речовини та їх розведення для методів РНГА та РЗК

Ступінь ацилювання ІГ*	Розведення імуноглобулінів мг/мл			
100	0,5	0,05	0,005	0,0005
75				
50				
25				
10				
5				
1				
Нативний Ig				

*100% СА прийнято за ацилювання всіх аміногруп білка, тобто 0,1 г янтарного ангідриду на 0,0992 г білка.

відмивки ацильованих імуноглобулінів, еритроцити барана свіжі відмиті танізовані. Для встановлення концентрації білків використовували УФ-спектрофотометр СФ-40А фірми "ЛОМО" з фіксованою довжиною хвилі 280 нм та кварцеві кювети діаметром 0,05 мм.

Ацильовані імуноглобуліни синтезували згідно з методикою [8]: 0,1 г відповідного сухого ліофілізованого білка розчиняли у 10 мл фосфатного буфера, додавали туди відповідну кількість (табл.) сухого янтарного ангідриду, при постійному перемішуванні розчин інкубували в термостаті при 37°С протягом 3 діб. Потім до розчину додавали дві кратний розчин 80% сульфату амонію. Осад поліаніонного ІГ відділяли центрифугуванням, очищали діалізом та відмиванням на колонці з сефарозою G-50 (вихід білка встановлювали спектрофотометрично при 280 нм за поглинанням залишків ароматичних амінокислот у складі ІГ) і розчиняли у 0,9% розчині натрію хлориду, pH середовища доводили 1Н розчином лугу (натрію гідрооксиду) до pH=7,2. Концентрація білка за спектрофотометричними даними становила 0,5± ±0,05 мг/мл. Далі досліджували специфічність антитіл шляхом встановлення здатності ІГ викликати специфічну гемаглютинацію (РНГА) у різних концентраціях від 0,5 мг/мл до 0,0005 мг/мл. Використовували модифіковану методику непрямої гемаглютинації [7]. Згідно з цією методикою готували еритроцити, навантажені нормальним імуноглобуліном людини як антигеном та використовували далі для встановлення чутливості антитіл за розведенням (табл.) проти неацильованого контролю.

Також з метою дослідження стабільності антитіл до протеолізу по 5 мл нативного розчину

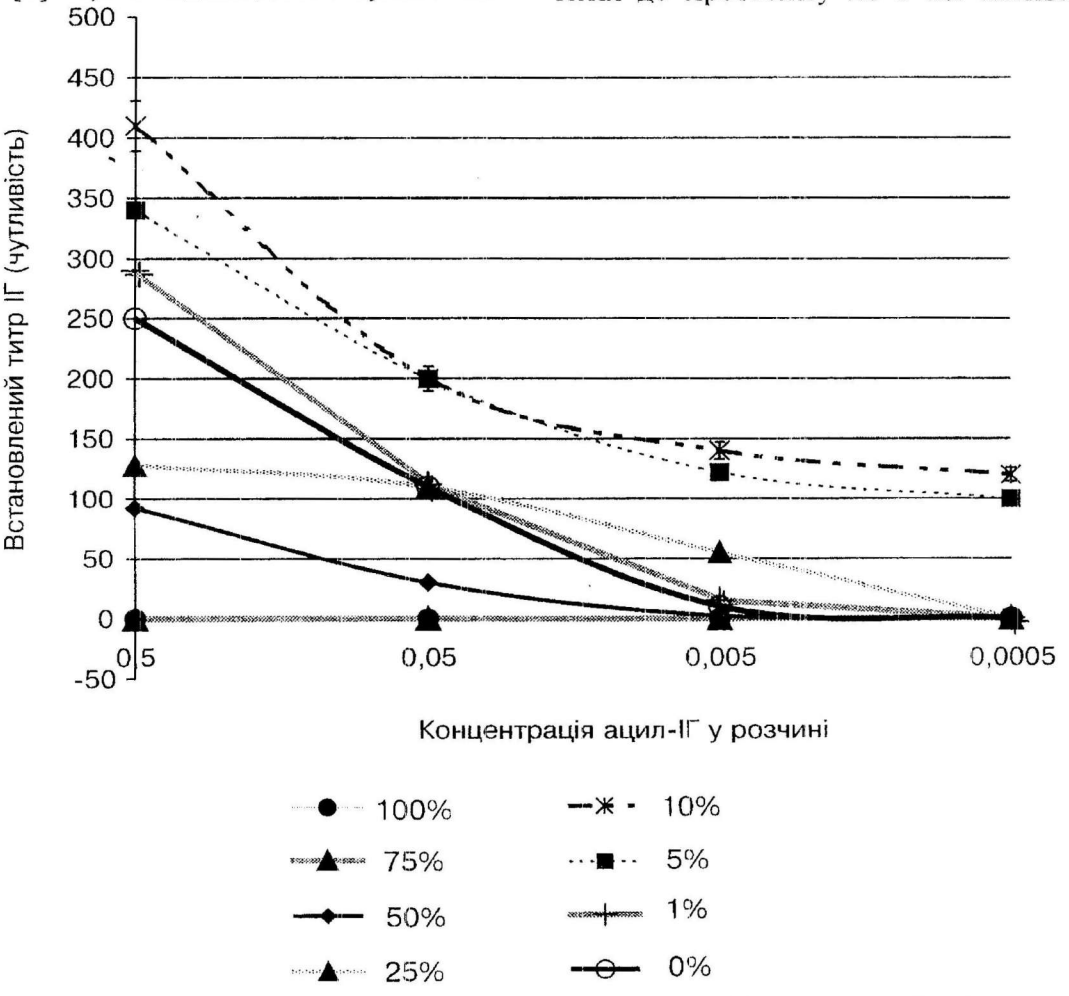

Рис. 1. Залежність між титром ацил-ІГ та розведення ІГ з різним ступенем ацилювання.

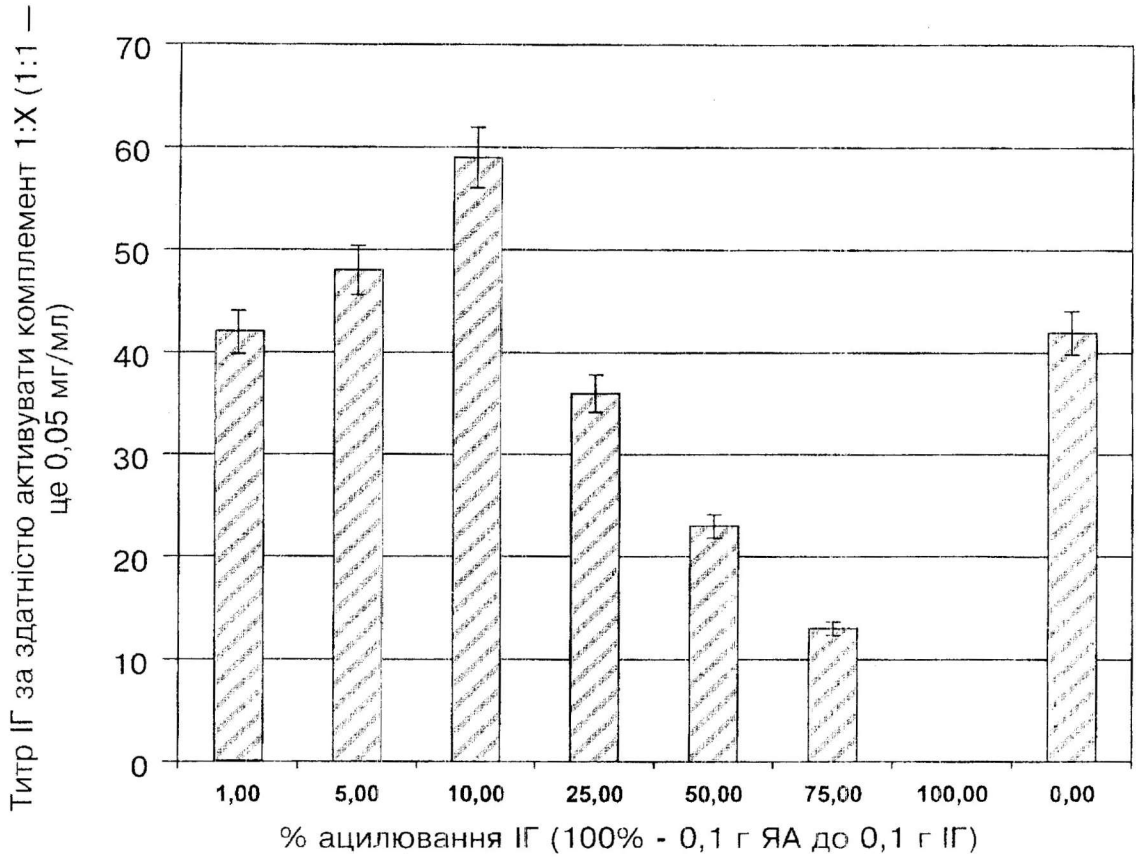

Рис. 2. Залежність між ступенем ацилювання ІГ та здатністю до активації комплементу (титр ІГ).

гідролізували протягом години на холоді трипсином та використовували для встановлення специфічності.

Для підтвердження здатності ацильованих імуноглобулінів зв'язувати комплемент проводили реакцію зв'язування комплементу (РЗК) [4]. В РЗК досліджували антитіла з різним ступенем ацилювання у десятикратних розведеннях від 0,5 мг/мл до 0,0005 мг/мл. (див. табл.)

Результати та їх обговорення

ІГ із СА=100% завдяки зміні третинної структури та загального заряду повинні були б втратити специфічність до антигена. Але відомо, що зв'язуючі властивості ацильованих альбумінів збільшуються проти нативних, а також після ацилювання білкових конгломератів ангідридами ди- та трикарбонових кислот ці структури дисоціюють завдяки посиленню загального негативного заряду та гідрофільності молекули [7]. В зв'язку з цим заряд Fab-компонентів антитіл може залишатися незмінним при збільшенні загального негативного заряду ІГ при ацилюванні не більш ніж 5-15% бокових лізинових аміногруп. Така структура буде менше реагувати з низькоафінними антигенами, не буде утворювати конгломерати з анти-ІГ.

Результати дослідження чутливості 64 зразків розведень ацильованих ІГ (32 з яких були оброблені трипсином для імітації протеолізу) в РНГА представлені на рис. 1.

Як видно з рисунка 1, тільки ІГ, які мали СА=5-10% у максимальному розведенні 0,0005 мг/мл, призводили до аглютинації еритроцитів з антигеном, тоді як неацильований контроль вже у концентрації 0,005 мг/мл не призводив до аглютинації навантажених антигеном еритроцитів. Також повністю втрачалася специфічність та чутливість імуноглобулінів до антигена при СА=75-100%. Таким чином, оптимальною є ступінь ацилювання 10-15% аміногруп, при якій спостерігається збільшення чутливості та специфічності імуноглобулінів на порядок.

На рис. 2 представлена залежність між ступенем ацилювання найбільш специфічних варіантів ацил-ІГ та здатністю активувати комплемент.

Як видно з рис. 2, нативні ІГ мали титр 1:42, тоді як повністю ацильовані ІГ не активували систему комплементу. Найбільшу здатність до активації комплементу мали ІГ із ступенем ацилювання 10% (1:59), тобто оптимальним є ступінь ацилювання 1:10.

На рисунках 1 та 2 не представлені дані про властивості ацильованих ІГ, які були оброблені трипсином (32 зразки). Це пов'язано з тим, що всі дослідні зразки ацил-ІГ повністю втрачали специфічність та здатність активувати комплемент. Таким чином, ацилювання імуноглобулінів не захищає останні від ферментативного протеолізу та в жодному разі не гальмує його.

ВИСНОВКИ

1. Специфічність імуноглобулінів, у яких 5-10% вільних аміногруп були ацильовані янтарним ангідридом, на 35-40% вище за спе-

цифічність нативних неацильованих імуноглобулінів.

2. Найбільш ефективно зв'язують комплемент ІГ, у яких 10% аміногруп було ацильовано янтарним ангідридом (у нативного ІГ титр складає 1:42, тоді як у ацильованого — 1:59).

3. Ацилювання ІГ янтарним ангідридом не збільшує їх стабільності щодо ферментативного протеолізу. Всі синтезовані ацил-ІГ з різним ступенем ацилювання втратили специфічність та здатність до активації комплементу при обробці трипсином.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Долгих В.Т. Основы иммунопатологии. — Н. Новгород: Изд-во НГМА, 1998. — 208 с.*
2. *Імунобіологічні препарати. Довідник / Смирнов В.В., Сельникова О.П., Думанський В.Д. та ін. — К.: Моріон, 2001. — 192 с.*
3. *Молекулярная клиническая диагностика. Методы. — М.: Мир, 1999. — С. 33-34.*
4. *Руководство по лабораторной диагностике вирусных и риккетсиозных болезней. — М.: Медицина, 1965. — 595 с.*
5. *Jansen R.W., Schols D., Pauwels R. et al. // Mol. Pharmacol. — 1993. — Vol. 44. — P. 1003-1007.*
6. *Khaw B.A., Torchilin V.P., Klibanov A.L. // J. Mol. Cell. Cardiol. — 1989. — Vol. 21, №1. — P. 31-35.*
7. *Palacian E., Gonzalez P.J., Pineiro M., Hernandes F. // Mol. Cell. Biochem. — 1990. — Vol. 97, №2. — P.101-111.*
8. *Schoen P., Crver J., Meijer D.K. et al. // Biochem. Pharmacol. — 1997. — Vol. 53. — P. 995-1003.*

УДК 57.083.2+578.74

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ, АЦИЛИРОВАННЫХ ЯНТАРНЫМ АНГИДРИДОМ

А.В.Мартынов, В.П.Черных

Приведены данные о результатах изучения биологических свойств иммуноглобулинов, ацилированных янтарным ангидридом. Целью исследования было установление оптимальной степени ацилирования иммуноглобулинов, при котором их специфичность возрастает и сохраняется способность активировать комплемент. Установлено, что полное ацилирование свободных аминогрупп в антителах приводит к утрате ими специфичности и способности активировать комплемент. Ацилирование 5-10% аминогрупп увеличивает их чувствительность на порядок и фактически не меняет их способность связывать комплемент. Также показано, что ацилированные иммуноглобулины с различной степенью ацилирования после их обработки трипсином полностью утратили способность вызывать агглютинацию нагруженных антигеном эритроцитов и связывать комплемент после их обработки трипсином, то есть их стабильность к протеолизу не увеличилась после ацилирования.

UDC 57.083.2+578.74

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF SUCCINYLATED IMMUNOGLOBULINES

A.V.Martynov, V.P.Chernykh

The article deals with the results of study of succinylated immunoglobulins biological properties. The purpose of research was an establishment of an optimal immunoglobulins acylation degree, at which their specificity grows and remains the ability for complement promotion. We have fixed that the complete acylation of free aminogroups in antibodies results in loss by them of specificity and ability to promote a complement. The acylation of 5-10% aminogroups increases their sensitivity and does not actually change their ability to bind a complement. It has been also shown that succinylated immunoglobulins with a various degree of an acylation after their processing by trypsinum have lost their ability to produce agglutination laden with an antigen of erythrocytes and to bind a complement. So, their stability to proteolysis has not increased after acylation.