

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КОПРОПОРФИРИНОВЫХ КОНЪЮГАТОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

GETTING AND CHARACTERISTICS OF COPROPORPHYRIN CONJUGATES OF MONOCLONAL ANTIBODIES

Я. И. Мельникова, Я. В. Лайков
Y. Melnikova, Y. Laikov

*Белорусский государственный университет, МГЭИ им А.Д. Сахарова БГУ,
Минск, Республика Беларусь
laykovyan270599@gmail.com
Belarusian State University, ISEI BSU,
Minsk, Republic of Belarus*

Получены конъюгаты N-оксисукцинимидного эфира Pd(II)копропорфирина I с ферритинспецифичными моноклональными антителами субкласса IgG2a, в одностадийной реакции конъюгирования, с антигенсвязывающей активностью, увеличенной в 3–7 раз. Двухфазная зависимость функциональной активности конъюгатов от глубины модификации свидетельствует о наличии двух популяций модифицируемых аминогрупп. Модификация более доступных из них приводит к функциональной активации молекулы IgG. Показаны преимущества в связывании с антигеном модифицированных моноклональных антител HSF 102 по сравнению с нативными моноклональными антителами.

Conjugates of Pd (II) coproporphyrin I N-hydroxysuccinimide ester with ferritin-specific monoclonal antibodies of the IgG2a subclass were obtained in a one-step conjugation reaction, with antigen-binding activity increased by 3–7 times. The two-phase dependence of the functional activity of the conjugates on the depth of modification indicates the presence of two populations of modified amino groups. Modification of the more accessible ones leads to functional activation of the IgG molecule. Advantages in binding to an antigen of modified monoclonal antibodies HSF 102 compared to native monoclonal antibodies are shown.

Ключевые слова: моноклональные антитела, иммуноглобулин G, металлопорфириновые конъюгаты, люминесцентный иммуноанализ.

Keywords: monoclonal antibodies, immunoglobulin G, metalloporphyrin conjugates, luminescent immunoassay.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2021-2-73-76>

Одним из наиболее чувствительных методов люминесцентного иммуноанализа является метод, в котором используются ковалентно связанные с антителами или антигенами порфириновые соединения, в качестве которых используют различные типы флуоресцирующих порфиринов. Особое внимание на сегодняшний день уделяется группе копропорфиринов. Эти порфирины водорастворимы, имеют достаточно высокий квантовый выход флуоресценции (до 0,2), разнесенные по длинам волн более чем на 180 нм области возбуждения (380–420 нм) и излучения (600–640 нм) и флуоресценции, позволяют получить довольно высокую чувствительность иммуноанализа.

Существование длительной люминесценции палладий-копропорфирина со временем затухания $1,2 \cdot 10^{-3}$ с позволяет использовать его в иммунолюминесцентном анализе с временным разрешением при чувствительности определения иммунологических компонентов до 10^{-12} М.

Ранее предложенные методы получения подобных конъюгатов требовали двухстадийной реакции конъюгирования с активацией порфиринов на первой стадии и сопровождалась значительным снижением функциональной активности антител. Целью данной работы было получить металлопорфириновые конъюгаты антител с неизменной функциональной активностью в одностадийной реакции конъюгирования

С помощью метода химической модификации антител, основанного на количественном присоединении молекул N-оксисукцинимидного эфира Pd(II)-копропорфирина I к моноклональным антителам HSF 102, были получены специфические порфириновые конъюгаты с глубиной модификации равной 0,7; 1,0; 1,7; 2,4; 3,7 молекулы модификатора на молекулу белка.

Палладий-копропорфириновые конъюгаты моноклонального антитела HSF 102, с глубиной модификации 1,0 (Рис. 1) показали превышение параметров аффинности в 7 раз по сравнению с немодифицированным мАТ HSF 102.

Увеличение глубины модификации моноклональных антител палладий-копропорфирином до 1,7 также привело к активации способности полученных конъюгатов связывать антиген (Рис. 2). При этом данный параметр превысил показатели нативных моноклональных антител в 4,8 раза.

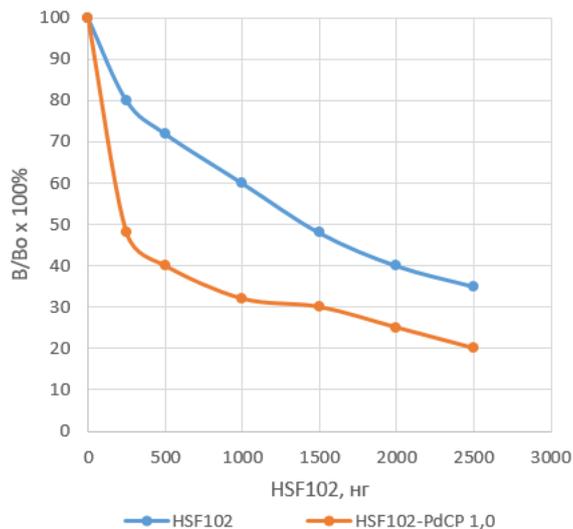


Рис. 1 – Определение параметров связывания антигена нативными и модифицированными Pd(II) копропорфирином моноклональными антителами HSF 102. Глубина модификации МАТ HSF102-PdCP – 1.0

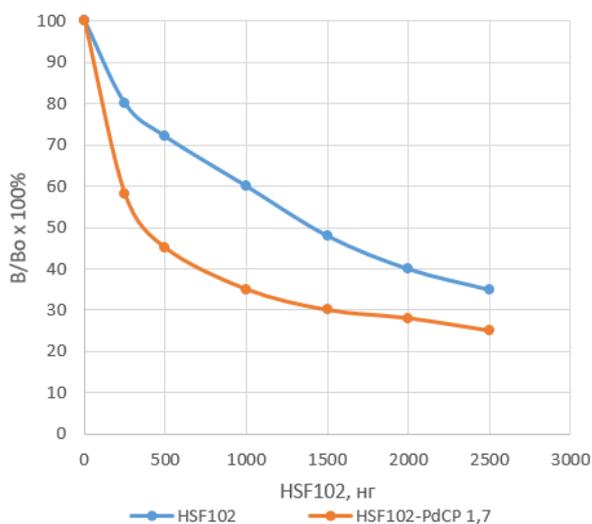


Рис. 2 – Определение параметров связывания антигена нативными и модифицированными Pd(II) копропорфирином моноклональными антителами HSF 102. Глубина модификации МАТ HSF102-PdCP – 1.7

При использовании в конкурентном анализе конъюгатов HSF102-PdCP с глубиной модификации 2,4 (Рис. 3) концентрация полумаксимального ингибирования связывания была в 5 раз ниже у конъюгата чем у нативного антитела, что свидетельствует о 5-кратном возрастании способности порфиринового конъюгата связывать антиген.

Конъюгаты МАТ HSF 102 с наибольшей глубиной модификации, равной 3,7 (Рис. 4), также показали в конкурентном анализе увеличение антигенсвязывающей способности в 4,6 раза по сравнению с нативным МАТ HSF 102.

В работе К. Смит и ее соавторов было установлено, что порфириновые конъюгаты моноклональных антител с глубиной модификации от одной до трех молекул порфирина на молекулу белка, обладают повышенной антигенсвязывающей активностью, но увеличение этого параметра было не столь значительным.

По данным Chrysovalanto Staneloudi и соавт. порфириновые конъюгаты моноклональных антител с глубиной модификации от 0,67 до 2 проявляли повышенную способность связывать антиген, повышение глубины модификации до 4–5 приводило к снижению биологической активности конъюгатов.

Данные исследования согласуются также с результатами работы Н. Малатести и соавт. в которых описывается отсутствие потери антигенсвязывающей активности порфириновых конъюгатов моноклональных антител по сравнению с нативными антителами. Антигенсвязывающую активность в данной работе измеряли методом цитофлуориметрии.

В работах С. Банфи и соавт. упоминается об не уступающих фототоксических эффектах порфириновых конъюгатов моноклональных антител по сравнению с другими фотосенсибилизаторами, использующимися в фотодинамической терапии, но при этом конъюгаты порфиринов с моноклональными антителами значительно повышали специфичность действия по сравнению с теми же современными фотосенсибилизаторами.

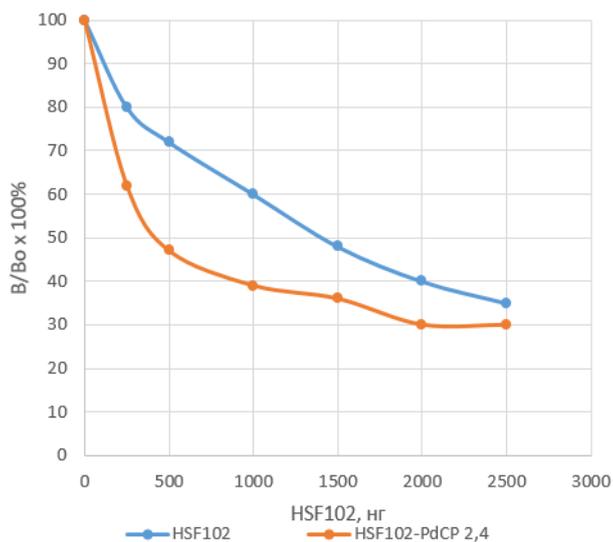


Рис. 3 – Определение параметров связывания антигена нативными и модифицированными Pd(II) копропорфирином моноклональными антителами HSF 102. Глубина модификации МАТ HSF102-PdCP – 2.4

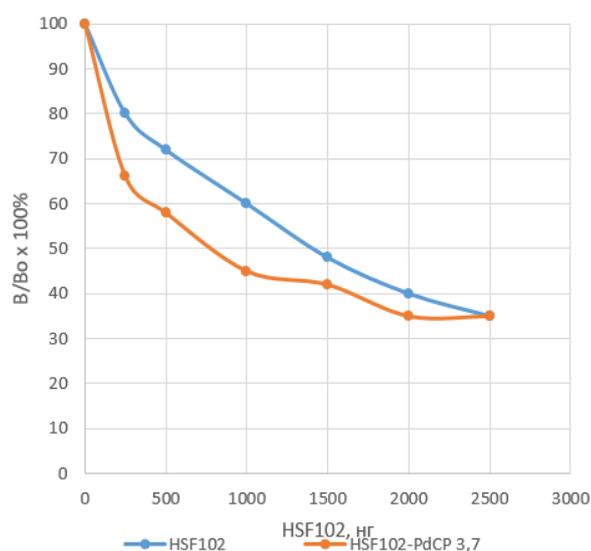


Рис. 4 – Определение параметров связывания антигена нативными и модифицированными Pd(II) копропорфирином моноклональными антителами HSF 102. Глубина модификации МАТ HSF102-PdCP – 3.7

Анализируя полученные результаты, следует отметить двухфазную зависимость активности антител от глубины модификации с максимумом эффекта активации при модификации одной аминокислотной группы моноклонального антитела HSF102.

Превышение оптимальной глубины модификации не дает обычных эффектов снижения антигенсвязывающей активности. Такая зависимость свидетельствует как о наличии более чем одного фактора, определяющего функциональные эффекты модификации молекулы иммуноглобулина, так и о возможном существовании двух популяций модифицируемых аминокислотных групп белка.

Модификация палладий-копропорфирином более доступных аминокислотных групп на поверхности белка приводит к функциональной активации всей молекулы IgG, связывание же модификатора со второй популяцией аминокислотных групп вызывает инактивирующий эффект.

Перспективы данного метода модификации моноклональных антител определяются возможностью повышения специфичности различных веществ, используемых в иммунофлуоресцентных и иммунофосфоресцентных методах иммуноанализа, а также имеют значительный потенциал в качестве фотосенсибилизатора для фотодинамической терапии при лечении злокачественных новообразований.

Фотодинамическая терапия становится все более эффективным методом лечения опухолей, но часто ограничивается побочными эффектами. Эта проблема решается путем конъюгирования фотосенсибилизатора с опухолеспецифическими моноклональными антителами, которые в свою очередь повышают специфичность самого фотосенсибилизатора и позволяет не воздействовать на окружающие опухоль ткани. Также при использовании

порфириновых конъюгатов с моноклональными антителами и радиоактивными металлами можно использовать для лечения опухолей, путем выборочного облучения необходимых малигнизированных тканей.

Таким образом с использованием твердофазного конкурентного иммунохимического анализа определены константы взаимодействия полученных палладий-порфириновых конъюгатов с антигеном и установлено, что параметры антигенного связывания всех конъюгатов превосходят параметры взаимодействия с антигеном нативных моноклональных антител HSF 102 в 4–7 раз.

Определена оптимальная глубина модификации моноклональных антител при использовании данного модификатора, которая составляет 1 молекулу модификатора на одну молекулу иммуноглобулина.

Полученные модифицированные N-оксисукцинимидным эфиром Pd(II)копропорфирина I антитела, представляют собой иммунохимические реагенты с антигенсвязывающей активностью, увеличенной в результате возрастания конформационной подвижности всей молекулы антитела.

Функциональная активация антител при их модификации наилучшим образом отвечает целям получения порфириновых конъюгатов антител с максимальной иммунореактивностью и дает значительные преимущества при биомедицинском использовании таких конъюгатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Aguilar-Ortiz E.* Porphyrins as Ligands: Background and Trends/ Aguilar-Ortiz E, Jalilian A, Avila-Rodriguez MA// Medicinal Chemistry Community. 2018. P. 1–5.
2. *Banfi S.* Photodynamic effects of porphyrin and chlorin photosensitizers in human colon adenocarcinoma cells / Banfi S, Caruso E, Caprioli S // Bioorganic and Med Chemistry. 2004.
3. *Malatesty N.* Synthesis and in vitro investigation of cationic 5,15-diphenyl porphyrin-mono-clonal antibody conjugates as targeted photodynamic sensitizers / Malatesty N [et al] // International journal of Oncology. 2005. P. 1561–1568.
4. *Smith K.* Mono- and tri-cationic porphyrin-mono-clonal antibody conjugates: photodynamic activity and mechanism of action / K. Smith [et al] // Immunology. 2010. P. 256–265.
5. *Staneloudi C.* Development and characterization of novel photosensitizer: scFv conjugates for use in photodynamic therapy of cancer / Staneloudi C [et al] // Immunology. 2007. 514–517 p.

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСА P2Y12 РЕЦЕПТОРА ЧЕЛОВЕКА С МОЛЕКУЛОЙ R-138727

MOLECULAR MODELING OF THE P2Y12 COMPLEX OF HUMAN RECEPTOR WITH R-138727 MOLECULE

A. A. Морозова, А. В. Бакунович

A. A. Morozova, A. V. Bakunovich

Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ

г. Минск, Республика Беларусь

a.a.morozova22@gmail.com

Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

a.a.morozova22@gmail.com

Ведущей причиной смерти человека во всем мире является атеротромбоз различной локализации. Ключевым моментом в борьбе с данной патологией является назначение антиагрегантов. Данные лекарственные средства отличаются между собой по механизму ингибирования активности тромбоцитов. Прасугрел - антагонист класса тиенопиридинов, является сильным ингибитором активации и агрегации тромбоцитов, опосредованной тромбоцитарными АДФ-рецепторами класса P2Y12.

The leading cause of human death throughout the world is atherothrombosis of various localization. The key point in the fight against this pathology is the appointment of antiplatelet agents. These drugs differ from each other in the mechanism of inhibiting platelet activity. Prasugrel, an antagonist of the thienopyridine class, is a potent inhibitor of platelet activation and aggregation mediated by platelet ADP receptors of the P2Y12 class.

Ключевые слова: прасугрел, P2Y12, агрегация тромбоцитов.

Keywords: Prasugrel, P2Y12, platelet aggregation.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2021-2-76-79>

Антиагреганты – лекарственные средства, препятствующие тромбообразованию за счет уменьшения функциональной активности тромбоцитов.