

## ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ХИМЕРНЫХ АНТИТЕЛ К БОТУЛОТОКСИНУ ТИПА А

Рябко А.К., Марьин М.А., Зенинская Н.А., Rogozin M.M., Силкина М.В., Карцева А.С., Романенко Я.О., Фирстова В.В.

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk, Россия

## PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF CHIMERIC ANTIBODIES TO BOTULOTOXIN TYPE A

Ryabko A.K., Marin M.A., Zeninskaya N.A., Rogozin M.M., Silkina M.V., Kartseva A.S., Romanenko Ya.O., Firstova V.V.

State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia

**Цель исследования:** создание новых химерных антител, специфически связывающих и инактивирующих ботулинический нейротоксин типа А *Clostridium botulinum*.

**Материалы и методы** Панель антиботулинических мышиных моноклональных антител (МКАт) к рекомбинантными доменам ботулотоксина А получена с помощью классической гибридомной технологии. МКАт охарактеризованы *in vitro* и *in vivo*. Из охарактеризованной панели выбраны три антитела – СВ-LCA-1.4 и СВ-LCA-2.55, специфичные к легкой цепи, и СВ-HCA-2.11, специфичное к тяжелой цепи токсина, проявляющих высокую специфичность и антитоксическую активность. Наилучшие результаты отмечены при использовании смеси всех трех антител в равном соотношении. Выбранные МКАт подвергнуты химеризации. Для этого была сконструирована новая би-промоторная плазмида p2хeCMV5-ММ, содержащая две разнонаправленные экспрессионные кассеты, фланкированные областями для PiggyBac-опосредованной транспозиции. Эффективность экспрессии этих генов улучшена за счет модификации промоторных и введения усиливающих областей. Получены стабильные клеточные линии-продуценты на основе клеток ехрiСНО-S. Химерные МКАт охарактеризованы по активности и специфичности иммуноферментным анализом, в иммуноблоте, при помощи SPR-анализа, также исследована антитоксическая активность *in vitro* и *in vivo*.

**Результаты.** Полученные стабильные линии-продуценты химерных антител хiСВ-HCA-2.11, хiСВ-LCA-1.4 и хiСВ-LCA-2.55 при мелкомасштабном культивировании в лабораторных условиях позволяют получить до 150 мг/л антител. Подтверждена чистота и специфическая активность химерных МКАт *in vitro* и *in vivo*. При помощи SPR-анализа был измерен параметр  $K_D$  для каждого из антител, который находится в наномолярном диапазоне.

**Заключение** Полученные химерные МКАт специфичны и высокоаффинны к целевым белкам-мишеням, обладают антитоксической активностью, могут быть рассмотрены в качестве кандидатов для создания терапевтического препарата.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение от 31 октября 2019 г. № 075-15-2019-1671).

## РАЗРАБОТКА СОРБЕНТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЦИТОКИНОВОГО ШТОРМА НА ОСНОВЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ОЛИГОПЕПТИДОВ

Рябцева Т.В., Макаревич Д.А.

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

## DEVELOPMENT OF SORBENTS FOR THE TREATMENT OF CYTOKINE STORM BASED ON SPECIFIC OLIGOPEPTIDES

Ryabtseva T.V., Makarevich D.A.

Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

**Цель исследования:** разработать сорбенты на основе иммобилизованных в полиакриламидный гель (ПААГ) специфических олигопептидов для снижения концентрации провоспалительных цитокинов, участвующих в развитии цитокинового шторма.

**Материалы и методы.** Для экспериментов использовали ПААГ и синтетические оригинальные олигопептиды, разработанные с помощью виртуального докинга: Trp-Asn-Trp-Val – для связывания ФНО-альфа, Trp-Asp-Phe-Asp – для связывания IL-8, Ser-Phe-Tyr-Arg – для связывания IL-6. Результаты представлены в виде медианы и 25- и 75-перцентилей.

**Результаты.** Концентрация IL-6 после ПААГ со специфическим пептидом снижается. В неподвижной фазе внутри гранул геля с пептидом сорбируется 42,61 (40,97; 54,55) пг/мл IL-6, в гранулах геля без пептида – 3,29 (2,79; 2,58) пг/мл. Константа распределения для IL-6 в ПААГ с пептидом – 1,36 (1,22; 1,41). Снижение концентрации IL-8 в плазме после гель-хроматографии в ПААГ с пептидом составило 175,71 (123,29; 192,76) пг/мл. Константа распределения для IL-8 в ПААГ с пептидом – 2,01 (1,53; 2,20). Концентрация ФНО-альфа после ПААГ со специфическим пептидом уменьшилась на 167,48 (132,75; 247,86) пг/мл, после геля без пептида – на 36,84 (25,85; 57,39) пг/мл. Иммобилизация олигопептида в ПААГ увеличивала константу распределения в 8 раз и составила 1,59 (1,11; 2,54).

Для аппроксимации полученных результатов в модельных экспериментах к их клиническому применению были произведены некоторые расчеты. Установлено, что для достижения терапевтического эффекта целесообразно увеличить концентрацию лиганда в ПААГ до 100 мкМ/мл, тогда количество удаляемых цитокинов IL-6, IL-8 и ФНО-α составит 27,7%, 92,05% и 59,4% соответственно от исходного патологического уровня цитокина.

**Заключение.** Предлагаемые сорбенты на основе оригинальных олигопептидов являются перспективными для разработки изделий медицинского назначения для экстракорпорального удаления провоспалительных цитокинов из плазмы крови при развитии цитокинового шторма.