



УДК 577.112.825.088.3:615.38

КЛИНИЧЕСКИЕ ИММУНОСОРБЕНТЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРНЫХ МАТРИЦ

*Чучалин А. Г., Горчаков В. Д., Лебедин Ю. С.,
Авдюшкина Т. В., Сакобынский К. И.*

*Всероссийский научно-исследовательский институт химических реактивов
и особо чистых химических веществ,
Москва*

Изучена возможность синтеза клинических иммуносорбентов иммобилизацией анти-IgE на полимерных носителях трехмерной структуры с группами аминов и гидразидов алифатических кислот. Исследовано влияние концентрации активных групп на специфическую активность иммобилизованных антител. Показано, что стерилизация иммуносорбентов может быть проведена γ -облучением без заметной потери эксплуатационных характеристик. Проведено изучение динамики сорбции IgE из плазмы крови больных и выявлена возможность повторного использования иммуносорбентов после регенерации. На основании проведенного комплекса исследований наиболее перспективным для получения клинических иммуносорбентов признан сополимер акрилонитрила и дивинилбензола с гидразидными группами.

Наиболее перспективным методом выведения патологических белков из организма больных является иммуносорбция, базирующаяся на принципе их высокоспецифичного взаимодействия с антителами. Итогом этого взаимодействия является образование слабодиссоциированного в физиологических условиях комплекса [1]. Практическая реализация метода требует поиска для ковалентной иммобилизации антител носителей, обеспечивающих возможность создания иммуносорбентов, способных эффективно работать в системах экстракорпоральной детоксикации [2]. Эти носители должны легко активироваться, иметь поры достаточно большого размера, исключая диффузионные эффекты при формировании иммунного комплекса, не должны выделять токсичных продуктов ни при хранении, ни при контакте с биологическими жидкостями, быть стойкими к инфицированию, выдерживать стерилизацию, обладать минимальной неспецифической емкостью. Оптимальные носители для клинической иммуносорбции должны иметь высокую механическую прочность и правильную сферическую форму, что позволит проводить перфузию с любыми допустимыми по физиологическим параметрам скоростями потока биологических жидкостей.

Наиболее полно этому комплексу требований отвечают гранулированные макропористые сополимеры трехмерной структуры, синтезированные с использованием дивинильных сшивающих агентов.

Целью данной работы было изучение возможности их использования для получения клинических иммуносорбентов, содержащих в качестве аффинного лиганда ковалентно иммобилизованные антитела к IgE человека. Выбор этого объекта обусловлен необходимостью повышения эффективности лечения ряда аллергозов, связанных с накоплением IgE в организме больного [3].

Концентрация IgE в плазме крови больных даже в случае тяжелых атопий составляет всего 3–6 мкг/мл [4], что требует для их иммуносорбционного извлечения высокоспецифичных антител. Эта специфичность должна в максимальной степени сохраняться и при их иммобилизации в полимерном геле. Известно, что сохранение нативной структуры иммобилизованных ковалентными связями белков во многом определяется поверхностной концентрацией активных группировок носителя, участвующих в формировании связей с их аминокислотными остатками [5]. Для

Влияние типа носителя и его характеристик на свойства иммуносорбентов

Марка		Концентрация активных групп, мкмоль/г	Емкость по IgE, мкг/г	
носителя	иммуносорбента		иммуносорбента	носитель
Сферон 1000	СФЕ-1	270	33,3±2,6	3,9
	СФЕ-2	550	29,0±2,4	4,6
	СФЕ-3	870	30,4±2,7	7,9
СД-10	СДЕ-1	3600	4,6±0,9	3,3
	СДЕ-3	180	51,8±5,9	2,3
СДН-1500	Бионит-Е1	200	57,8±6,1	1,6
	Бионит-Е2	980	43,8±4,6	1,9
	Бионит-Е3	1620	52,7±3,9	2,4
Сефароза CL-4В	СЕ	15	153,4±9,8	

количественной оценки влияния этого эффекта был синтезирован ряд иммуносорбентов на основе производимых в ЧССР носителей «Сферон», представляющих собой гидрофильный сополимер оксиэтилметакрилата с этилендиметакрилатом, в который методом полимераналогичных превращений введены ароматические аминогруппы, способные после активации к ковалентной иммобилизации белкового лиганда (табл. 1). Как видно из представленных данных, варьирование содержания этих групп в пределах от 270 до 870 мкмоль/г не приводит к сколько-нибудь значительному изменению активности иммобилизованного анти-IgE. Действительно, простейший расчет показывает, что для макропористых образцов полимерных носителей, имеющих поверхность порядка 6–8 м²/г и площадь, занимаемую одной активной группировкой, около 10⁻¹⁸ м², их эффективная концентрация составляет минимальную величину порядка 0,10 мкмоль/г. Учитывая, что для фиксации макромолекулы анти-IgE, имеющей молекулярную массу порядка 150 000, необходима площадка 4·10⁻¹⁶ м², легко подсчитать, что на одну макромолекулу белка приходится 4000 активных группировок, а максимальное количество иммобилизованного белка 50 мкг/г. И хотя в реальных условиях активные группы распределены статистически, находясь не только на доступной белку поверхности макропор, но и в микропористых и гелевых фрагментах сополимера, все же имеется их явный избыток, обеспечивающий многоточечную фиксацию биополимера.

Аналогичные результаты были получены при изучении отечественных носителей типа СДН-1500, представляющих собой продукт гидразинолиза макропористых сополимеров акрилонитрила и дивинилбензола, содержащий гидразидные группы. Увеличение концентрации этих групп в носителе от 200 до 1620 мкмоль/г слабо влияет на специфическую активность иммобилизованного анти-IgE. И лишь для носителя СД-10, представляющего собой макропористый сополимер стирола и дивинилбензола, содержащий ароматические аминогруппы, было установлено, что при концентрации активных групп 3600 мкмоль/г, иммобилизация анти-IgE проходит настолько жестко, что его способность к связыванию IgE практически утрачивается. В то же время иммуносорбент на основе носителя СД-10 с концентрацией ароматических аминогрупп 180 мкмоль/г по своим сорбционным характеристикам превосходит аналогичные иммуносорбенты на базе сферона (табл. 1).

Для практических целей важно сравнение жестких полимерных носителей с широко распространенными агарозными. Так, на базе гранулированной сефарозы CL-4В, имеющей равномерное распределение активных группировок в объеме геля в сочетании с оптимальной пористостью матрицы, получен чрезвычайно эффективный иммуносорбент с ковалентно иммобилизованным анти-IgE (табл. 1). Вместе с тем этот иммуносор-

бент изменяет свою активность при хранении, не может быть стерилизован традиционными методами, его трудно получить в виде достаточно крупных гранул. Все это существенно усложняет как технологию его получения, так и клиническое использование.

Применение градулированных полимерных носителей для синтеза иммуносорбентов более перспективно. Так, их сорбционная емкость при хранении более 40 сут практически не изменялась; они обладают высокой механической прочностью; проблема стерилизации может быть успешно решена таким прогрессивным методом, как радиационное облучение (табл. 2).

Как видно из представленных данных, радиационная стерилизация приводит к снижению емкости иммуносорбентов по IgE, которое в значительной мере коррелирует с концентрацией активированных группировок в исходных полимерных носителях. Причем, чем выше эта концентрация, тем больше потеря активности иммобилизованного анти-IgE, хотя в области 200–500 мкмоль/г отмечается определенный оптимум. Снижение сорбционной активности может быть объяснено появлением дополнительных сшивок белковых молекул радикалами, образующимися при взаимодействии γ -квантов с непрореагировавшими активированными группировками или продуктами их распада.

Как следует из результатов, полученных в ходе этого эксперимента, оптимальными носителями для синтеза клинических иммуносорбентов являются СД-10 и СДН-1500 с содержанием активных группировок соответственно 180 и 200 мкмоль/г. Однако, учитывая величину неспецифической сорбции (табл. 1), воспроизводимость физико-химических характеристик и технологические аспекты синтеза, для дальнейшего исследования выбрали СДН-1500. Иммуносорбент Бионит-Е1, полученный на его основе, испытан в динамическом эксперименте, моделирующем реальные условия схемы экстракорпоральной детоксикации больных. Соответствующие результаты приведены на рис. 1. Расчет емкости иммуносорбента по IgE, проведенный исходя из выходной кривой [2] и по снижению концентрации этого белка во всем объеме перфузированной плазмы, дал близкие результаты — 93,4 и 97,5 мкг/г соответственно. Это почти вдвое превышает величину статической емкости, что объясняется тем, что в данном случае концентрация IgE на входе в колонку постоянна и равна исходной, а в случае статического эксперимента она непрерывно снижается вплоть до установления равновесного значения.

С учетом высокой стоимости иммуносорбентов на основе анти-IgE важным является вопрос их повторного использования. Как показал эксперимент (рис. 2), после регенерации кислым глициновым буфером Бионит-Е1 может быть использован повторно; при этом его емкость, рассчитанная по выходной кривой, составляет 84 мкг/г, а по снижению концентрации в перфузированной плазме — 122 мкг/г. Это существенное расхождение, вероятно, обусловлено ошибками при определении концентрации IgE; более правильным является расчет емкости по выходной кривой.

Таблица 2

Изменение активности иммуносорбентов на базе полимерных матриц с ковалентно иммобилизованным анти-IgE при γ -облучении дозой 25 кГр

Марка иммуносорбента	Емкость по IgE, мкг/г		Активность, % к исходному сорбенту
	до облучения	после облучения	
СФЕ-1	30,4±2,6	24,2±3,1	73
СФЕ-2	29,0±2,4	24,5±1,9	84
СФЕ-3	30,4±2,7	19,2±1,1	63
СДЕ-3	51,8±5,9	40,9±3,8	79
Бионит-Е1	57,8±6,1	40,6±2,1	70
Бионит-Е2	43,8±4,6	34,6±1,3	79
Бионит-Е3	52,7±3,9	26,9±0,9	51

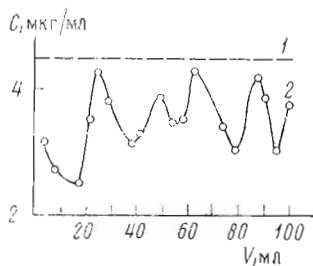


Рис. 1

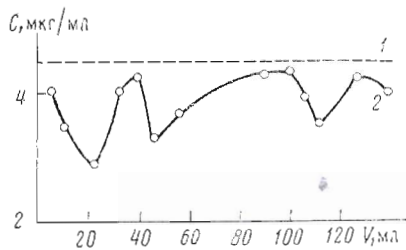


Рис. 2

Рис. 1. Динамика сорбции IgE иммуносорбентом Бионит-Е1: 1 — концентрация IgE на входе в колонку; 2 — концентрация IgE на выходе из колонки. V — объем перфузии; скорость перфузии $w=0,83$ мл/мин, диаметр гранул сорбента $d=0,35-0,75$ мм, масса сорбента в колонке $g=1,0$ г, концентрация IgE после перфузии в объеме 100 мл $C_k=3,52$ мкг/мл

Рис. 2. Динамика сорбции IgE регенерированным иммуносорбентом Бионит-Е1. $w=1,15$ мл/мин, $d=0,35-0,75$ мм, $g=1$ г, $C_k=3,58$ мкг/мл. Обозначение кривых как на рис. 1

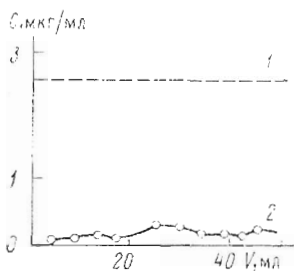


Рис. 3

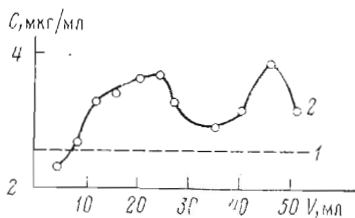


Рис. 4

Рис. 3. Динамика сорбции IgE из плазмы иммуносорбентом на основе сефарозы CL-4B. $w=0,83$ мл/мин, $d=0,06-0,14$ мм, $g=0,5$ г, $C_k=0,21$ мкг/мл. Обозначения кривых как на рис. 1

Рис. 4. Динамика изменения концентрации IgE в ходе перфузии через исходную агарозу CL-4B. $w=0,83$ мл/мин, $d=0,06-0,14$ мм, $g=1,0$ г, $C_k=3,00$ мкг/мл

При анализе полученных данных видно, что в случае полимерного сорбента Бионит-Е1 концентрация IgE на выходе из колонки составляет в среднем 60–70% от исходной; кроме того, зависимость выходной концентрации от времени имеет четко выраженный волнообразный характер (рис. 1). Это свидетельствует о лимитировании процесса сорбции непосредственно стадией образования комплекса IgE с иммобилизованными антителами. Вероятно, частично гидрофобный характер полимерной поверхности значительно затрудняет транспортировку находящихся в водном растворе молекул иммуноглобулина к местам иммобилизации антител и снижает скорость реакции комплексообразования. Устранение этих недостатков может быть обеспечено соответствующей модификацией полимера с целью повышения гидрофильности и уменьшением размера его гранул, что позволит существенно ускорить стадию массопереноса. При сопоставлении выходных кривых полимерного (рис. 1) и сефарозного (рис. 3) иммуносорбентов видно, что во втором случае идет практически полное поглощение IgE из перфузируемой плазмы больного. Это подтверждается и величиной емкости по IgE, составляющей 228 мкг/г.

Заслуживает интереса вид выходной кривой при перфузии плазмы через контрольный образец геля сшитой агарозы CL-4B, не содержащей белкового лиганда (рис. 4). Значительное повышение концентрации IgE на выходе из колонки может быть объяснено диссоциацией имеющихся иммунных комплексов, что приводит к выбросу свободного IgE. Это

явление нуждается в дополнительном исследовании, так как оно непосредственно влияет на эффективность работы иммуносорбента.

Выводы

1. Полимерные матрицы с группами ароматических аминов и гидразидов алифатических кислот являются перспективными носителями для создания иммуносорбентов с иммобилизованными антителами.

2. По удельной связывающей способности эти иммуносорбенты в 3-4 раза уступают иммуносорбенту на основе сефарозы CL-4B по данным как статических, так и динамических экспериментов.

3. Иммуносорбенты на основе полимерных носителей выдерживают стерилизацию γ -облучением дозой 25 кГр*, имеют высокую механическую прочность и правильную сферическую форму, их емкость в реальных условиях может быть доведена до 40 мкг IgE на 1 г сухого сорбента.

4. Иммуносорбент Бионит на основе гидразидсодержащего сополимера СДН-1500 способен к регенерации, что позволяет провести повторную иммуносорбцию с его использованием.

5. Необходимы дальнейшие исследования с целью повышения эффективности иммуносорбентов на основе полимерных матриц и разработка методов регенерации, обеспечивающих полноту элюирования сорбированных иммуноглобулинов.

Экспериментальная часть

В качестве полимерных носителей для синтеза иммуносорбентов использованы макронорные сополимеры гидроксиметакрилата и этилсидиметакрилата с первичными ароматическими аминогруппами (Сферон, СССР), акрилонитрила и дивинилбензола с гидразидными группами (СДН-1500, СССР), стирола и дивинилбензола с первичными ароматическими аминогруппами (СД-10, СССР). Сополимеры получены методом суспензионной сополимеризации в присутствии инертных порообразователей [6]. Носители представляют собой механически прочные гранулы правильной сферической формы с диаметром 0,35-0,50 мм.

Иммобилизацию анти-IgE проводили по стандартной методике с предварительным переводом ароматических аминогрупп в диазогруппы, а гидразидных — в ацидазидные группы [7].

Для иммобилизации использован препарат кроличьих антител (Ig-фракция) против IgE человека (Dakopatts, Дания) из расчета 10 мг белка на 1 г сухого носителя. Образцы, использованные в качестве контроля в динамических экспериментах, содержали иммобилизованный нормальный кроличий гамма-глобулин (Serva, ФРГ), взятый также из расчета 10 мг белка на 1 г носителя. После иммобилизации иммуносорбенты отмывали от сорбированного белка, не вошедшего в реакцию с активированными группировками. Промывка осуществлялась последовательно 1 М водным раствором NaCl, 0,1 М фосфатным буфером с pH 7,4 (буфер А), 0,14 М водным раствором NaCl с контролем наличия белка в промывных водах по стандартным методикам [8]. Готовый иммуносорбент заливали 0,1 М фосфатным буфером с pH 7,4. Иммобилизацию анти-IgE на активированной бромидном сефарозе CL-4B (Pharmacia, Швеция) проводили из соотношения 20,5 мкг белка на 1 г сухого геля по стандартным методикам [9].

Стандартная плазма (СП) с высоким содержанием IgE (3,5-4,5 мкг/мл) получена при плазмаферезах у больного с атопическим дерматитом (НИИ иммунологии МЗ СССР, врач Феденко Е. С.). Препарат меченого ^{125}I миеломного IgE получен от фирмы Pharmacia (Швеция) — IgE RIA Tracer, Löt 9324, уд. акт. на время поставки 16 Ки/г, концентрация 29 нг/мл. Препарат меченого IgE перед использованием диализован для удаления низкомолекулярных фрагментов, содержащих ^{125}I . Диализ проводили против буфера А при 4°С в течение 16 ч.

Статические испытания иммуносорбентов проводили по следующей схеме: навески иммуносорбентов (0,02-0,07 г в пересчете на сухой вес) и образцы используемых в качестве контроля полимерных носителей переносили в полистирольные пробирки, свободную жидкость отсасывали. Затем в пробирки наливали 1,5-2,0 мл СП и 100-200 мкл препарата меченого IgE, смесь тщательно перемешивали и инкубировали 2 ч при 20°С и постоянном перемешивании. Затем образцы отделяли, 5 раз промывали 2,0-2,5 мл буфера А, содержащего 0,1% Твин-20 (Serva, ФРГ) и измеряли их радиоактивность. Затем образцы высушивали до постоянной массы и взвешивали. Сорбцию выражали в мкг IgE на 1 г сухого иммуносорбента.

Динамические испытания иммуносорбентов проводили по следующей схеме: 1 г образца иммуносорбента помещали в хроматографическую колонку С 10/10 (Pharmacia, Швеция) и промывали 20 мл буфера А, содержащего 2,5% бычьего сывороточного альбумина (Serva, ФРГ). После этого через колонку со скоростью 0,9-

* 1 Гр (грей) = 100 рад.

1,1 мл/мин в течение 1–2 ч пропускали СП, собирая фракции объемом 0,25 мл каждые 5–10 мин. Регенерацию колонки проводили пятью объемами 0,1 М глицинового буфера с рН 2,5–2,7. После регенерации колонки промывали 10 объемами буфера А, содержащего 2,5% бычьего сывороточного альбумина, и хранили при 4°С в присутствии азида натрия. Концентрацию IgE определяли в исходной СП, в отобранных пробах и во всем объеме СП, прошедшем через колонку.

Для определения концентрации IgE твердофазным радиоиммунным методом 100 мкл анти-IgE, разбавленного 1:1000 0,01 М фосфатным буфером с рН 7,6–7,8, инкубировали 10–18 ч при 4°С в лунках поливинилхлоридных планшет (Immunoassay plates, Flou, Великобритания), отмывали 5 раз буфером А, содержащим 0,1% Твин-20 (буфер Б); в лунки вносили 200 мкл 2,5% раствора бычьего сывороточного альбумина в буфере А и инкубировали 2 ч при 20°С; отмывали 1 раз буфером Б. Исследуемую пробу плазмы, разбавленную не менее чем в 50 раз буфером Б (100 мкл), или 100 мкл стандартов из набора IgE PRIST (Pharmacia, Швеция) вносили в лунки и инкубировали 4 ч при 20°С; отмывали 7 раз буфером Б. Анти-IgE, меченные ¹²⁵I (100 мкл), вносили в лунки и инкубировали 4 ч при 20°С; лунки отмывали 7 раз буфером Б, планки разрезали и подсчитывали радиоактивность, связанную в лунках.

Для определения радиоактивности во всех опытах использовали колодезный счетчик Clinigamma-1281 LKB (Швеция).

Стерилизацию полимерных иммуносорбентов проводили γ -облучением дозой 25 кГр на гамма-установке РХМ- γ -100 (источник ⁶⁰Co). Мощность поглощенной дозы γ -излучения, определенная по ферросульфатному дозиметру, составила 0,16 Гр/с.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иммуносорбенты в очистке белков/Ред. Руослахти Э. М.: Медицина, 1979. С. 127.
2. Лопухин Ю. М., Молодцов М. Н. Гемосорбция. М.: Медицина, 1985. С. 285.
3. Sato H., Kidaka T., Hori M. // Artificial Organs. 1983. V. 7A P. 70.
4. Ichikawa I., Fukuda Y., Kitada H. // Ann. Allergy. 1982. V. 49. P. 295–297.
5. Озолинь А. Я., Арон А. К. // Тез. докл. IV Всесоюзного симпозиума по инженерной энзимологии. Киев, 1983. Ч. 2. С. 126.
6. Пашков А. Б. // Ионный обмен/Ред. Семянин М. М. М.: Наука, 1981. С. 63–72.
7. Inman I. K., Dinitzis H. M. // Biochemistry. 1969. V. 8. № 10. P. 4–74–4082.
8. Axen R., Ernback S. // Eur. J. Biochem. 1971. V. 18. P. 351–360.
9. Axen R., Porath J., Ernback S. // Nature. 1967. V. 214. P. 1302–1309.

Поступила в редакцию
16.II.1988

После доработки
28.VI.1988

CLINICAL IMMUNOSORBENTS BASING ON SPACE-NETWORK POLYMERS

CHUCHALIN A. G., GORCHAKOV V. D., LEBEDIN J. S.,
AVDYUSHKINA T. V., SAKODYNSKII K. I.

All-Union Research Institute of Chemical Reagents
and Chemicals of Special Purity, Moscow

Immobilization of anti-IgE on space-network polymers containing aliphatic amino- and hydrazido groups as a way of producing clinical immunosorbents has been studied. Influence of active group concentration on the specific activity of the immobilized antibodies and sorption dynamics of IgE from plasma of patents are investigated. Immunosorbents can be sterilized by γ -irradiation without any loss of capacity. It is shown that the immunosorbents can be reused after regeneration. Basing on the results obtained, acrylonitrile-divinylbenzene copolymer with hydrazido groups is considered as the most perspective for production of clinical immunosorbents.