

О.В. Стасишин<sup>1</sup>, В.В. Красівська<sup>1</sup>, Л.О. Матюха<sup>2</sup>, Н.М. Ворошилова<sup>2,3</sup>, С.В. Верьовка<sup>2,3</sup><sup>1</sup> ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України»,<sup>2</sup> Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця,<sup>3</sup> ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України»

## Агрегація білкових препаратів як передумова імунних ускладнень

### Стан проблеми

В основі перебігу багатьох патологічних станів лежить функціональна нестача певних регуляторних білків. Як правило, обумовлена вона генетичними причинами, що призводять до синтезу функціонально неповноцінних білків. Перша успішна спроба подолання подібного дефіциту за рахунок введення відповідного препарату пов'язана з відкриттям та впровадженням в медичну практику інсуліну – невеликого пептидного гормону, що регулює цілу низку процесів (рис. 1). Досить швидко з'ясувалось, що препарати донорного чи тваринного походження не здатні задовольнити постійно зростаючий попит як на цей препарат, так і на цілу низку інших білків для замісної терапії.

Наприкінці минулого сторіччя стрімкий розвиток біотехнології обумовив можливість отримання біологічно активних білків за допомогою рекомбінантних технологій, що призвело до появи на ринку щонайменше двох сотень лікарських засобів, отриманих з використанням методів біотехнології. Ще принаймні чотири сотні препаратів перебувають у процесі розробки [12]. До подібних сполук білково-пептидної природи належать різноманітні форми інсуліну, гормон росту, фактори зсідання крові, гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор, моноклональні антитіла та безліч інших сполук, що створюють нові можливості для ефективного впливу на різноманітні патологічні процеси. Щоправда, лишається невирішеною проблема ускладнень, обумовлених формуванням імунної реакції на введений препарат, що призводило до непередбачуваних побічних ефектів. Так, утворення антитіл до введеного інсуліну було виявлено Бантінгом ще в 1936 р. [6].

Незважаючи на досягнення сучасних біотехнологій, проблема імуногенності інсуліну як ключової обставини безпечності його застосування лишається відкритою [10]. Подібно до більшості біотехнологічних препаратів, обумовлено це складністю формування та підтримки просторової структури цього малого (молекулярна вага 5,8 кДа) білка, що складається з 51 амінокислотного залишка, з'єднаних у два прошитих трьома дисульфідними зв'язками поліпептидні ланцюги (див. рис. 1). Однак навіть за такої простої будови формування нативної структури рекомбінантного білка є складним багатостадійним процесом, ускладненим неоднозначністю вбудови потрібного фрагмента в ДНК клітини-продуцента, необхідністю забезпечення належних дисульфідних зв'язок, обмеженого протеолізу молекули проінсуліну та цілою низкою тією чи іншою мірою припустимих хімічних модифікацій.

Навіть високоочищені рекомбінантні препарати не є однорідними і містять цілий набір більш чи менш подібних між собою білкових молекул [4].

До того ж властивості рекомбінантних білків є вкрай чутливими до найменших і не завжди контрольованих змін технології їх отримання, що у випадку інсуліну ускладнює підбір дози і збільшує ризик розвитку гіпоглікемії [3]. Не менш показовими стали наслідки незначних змін технології рекомбінантного отримання невеликого (34 кДа) білкового гормону нирок еритропоетину, що обумовили смертельно небезпечні ускладнення [15]. Застосування замісних факторів зсідання крові призвело до формування цілого комплексу ускладнень, обумовлених формуванням автоімунної реакції як на введений препарат, так і на власні, і без того функціонально дефіцитні, фактори VIII та IX. Остання група ускладнень, що набули назви розвитку інгібітора, різко загострилась з впровадженням у клінічну практику саме рекомбінантних факторів (так званих препаратів III покоління), що відрізняються найвищою чистотою білкової складової [9].

Таким чином, формування імунної реакції на введені білкові препарати, розвиток автоімунних процесів та обумовлені ними ускладнення становлять тяжку і все ще позбавлену ефективного вирішення медико-соціальну проблему. Водночас узагальнення сучасних уявлень щодо шляхів формування структури білків та опосередкованих ними процесів міжмолекулярного розпізнавання дають

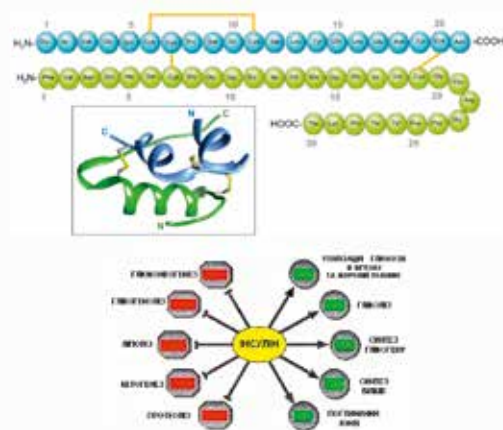


Рис. 1. Первинна послідовність молекули інсуліну людини, його просторова структура та провідні регуляторні функції (зелений колір – стимуляція, червоний – пригнічення).

змогу певною мірою пояснити причини розвитку цих вкрай небажаних процесів і обґрунтувати можливі підходи до їх мінімізації.

### Нативна структура білка та наслідки її порушення

Геном людини містить понад 20 тис. активних генів, що забезпечує синтез багатьох десятків, якщо не сотень, тисяч різноманітних білків, необхідних для функціонування цілісного організму. Кожна з білкових молекул зазнає різноманітних структурних перетворень, необхідних для виконання нею своїх функцій на кожному з численних етапів зігрівання. Починаючи з біосинтезу поліпептидного ланцюга і закінчуючи розщепленням відпрацьованих білкових молекул на амінокислоти, кожна білкова молекула перебуває в тісному взаємозв'язку з різноманітними системами та молекулярними компонентами організму.

Функціональна активність білкових молекул визначається способом укладки поліпептидного ланцюга – конформацією, що являє собою своєрідний компроміс між складним комплексом внутрішньомолекулярних взаємодій і впливом навколишнього середовища. Кожній з десятків тисяч білкових молекул притаманна певна правильна лише для неї нативна конформація, порушення якої призводить до зменшення або й зникнення відповідної функціональної активності [2].

Денатуровані білки швидко розпізнаються, зв'язуються та вилучаються молекулярними та клітинними компонентами кліренсових систем організму з наступним розщепленням до амінокислот ферментами протеасом чи лізосом. Формування функціонально активної конформації кожного з неосяжної кількості білків організму забезпечується дією так званої *шаперонової системи*, що містить кілька родин білків, здатних розпізнавати та зв'язувати денатуровані або неструктуровані білки, забезпечуючи останнім формування нативної конформації або сприяючи вилученню їх з обігу. При цьому щодо білків у нативній конформації шаперонові білки інертні.

Як структуроутворювальні, так і кліренсові системи організму функціонують узгоджено, розпізнаючи поверхню будь-якого білка як набір відносно невеликих кластерів, що мають відповідати існуючим у даній системі правилам [29]. Наявність на поверхні білка фіксованого угруповання, що не відповідає цим правилам, забезпечує розпізнавання молекули як «чужої», що підлягає вилученню або вилученню (рис. 2). Саме завдяки цьому як структуроутворювальні, так і кліренсові системи інертні по відношенню до нативних білків та енергійно взаємодіють з денатурованими та чужорідними.

Подібна узгодженість між шапероновою та кліренсовою системами пов'язана з еволюційно сформованою відповідністю між геномною та протеомною складовими кожного конкретного організму. Саме тому шаперонові білки забезпечують формування нативної структури лише власних білків клітини, тоді як стосовно еволюційно чужорідних, хоча й синтезованих у даній клітині, рекомбінантних вони неефективні. Це призводить до утворення так званих тілець включення – засмічених компонентами шаперонової та убіквітин-лігазної систем нерозчинних агрегатів цільового білка. Реактивація подібного продукту, вірніше – переведення його в розчинну і, головне, функціонально активну нативну конформацію, становить складну і все ще далеку від повного вирішення проблему сучасної біотехнології [1, 28]. Тож не доводиться

дивуватись, що будь-які рекомбінантні білкові препарати навіть за найдосконалішої ренатурації та очистки являють собою суміш більш чи менш подібних між собою білкових молекул [4, 21].

Подібний склад сам по собі може обумовлювати імуногенність препарату, однак значно вагомішою обставиною в цьому відношенні видається схильність денатурованих білків до утворення агрегатів і здатність сформованих агрегатів до автохтонного росту за рахунок сорбції та перебудови за власною подобою оточуючих білків.

### Мінорна домішка з тяжким впливом

Як вже відмічалось, нативна конформація білка є компромісом між сформованими під впливом шаперонової системи внутрішньомолекулярними взаємодіями та впливом навколишнього середовища. Порушення цього компромісу під впливом навколишнього середовища призводить до зміни укладки поліпептидного ланцюга в бік мінімізації вільної енергії системи. Серед незліченної кількості можливих структур денатурованих білків свого роду «енергетичним дном» є  $\beta$ -структуровані фібрили (рис. 3) [20]. Через енергетичну вигідність спонтанне утворення  $\beta$ -структурованих білкових агрегатів супроводжують різноманітні патологічні процеси, пов'язані з порушенням білкового обміну [5, 33]. Утворені при цьому агрегати відзначаються високою стабільністю структури, нерозчинністю та стійкістю до протеолізу. Вони здатні до розростання за рахунок сорбції та перебудови за власним порядком

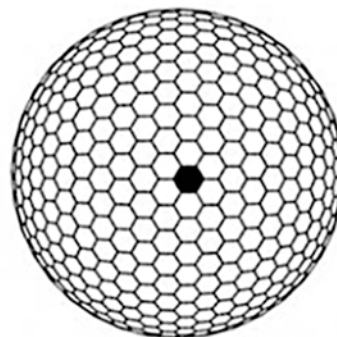


Рис. 2. Схематичне зображення поверхні білкової глобули як сукупності мікрокластерів, серед яких є один, що не відповідає прийняттю в даній біологічній системі структурним правилам [29]

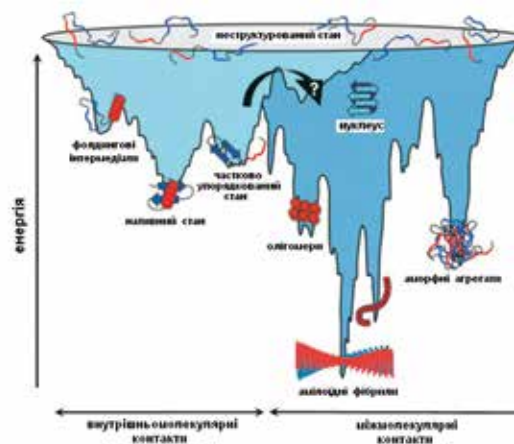


Рис. 3. Схема розподілу енергії білкових молекул за різного структурного стану [20]

розчинних білків. При цьому формування поверхні таких структур відбувається за правилами, що не мають нічого спільного з опосередкованим шапероновою системою нативним холдингом, що гарантує розпізнавання їх поверхні як «чужої», а отже – імуногенної [2, 29].

Моделювання подібних процесів за умов *in vitro* та *in vivo* давно й успішно проводиться з метою дослідження окремих стадій процесів, пов'язаних з різноманітними формами амілоїдозів. Розростання спонтанно сформованого зародка (нуклеусу) невідворотно проходить через стадію утворення нанорозмірного супрамолекулярного мультимеру з високостабілізованою, а отже – й імуногенною поверхнею (рис. 4) [27].

Тому правомірно говорити про автоад'ювантні властивості подібного роду мультимерів, чия жорстка структура забезпечує фіксацію імуногенних поверхневих детермінант. Це різко збільшує імуногенність мультимерів, а в разі їх наявності в білкових препаратах стає провідною причиною розвитку імунної реакції. З подібною точкою зору добре узгоджуються дані про те, що саме агреговані форми становлять причину імуногенності препаратів інсуліну [14, 19, 22].

Варто відмітити, що внаслідок дифракційного обмеження Аббе будь-які частки, менші за 0,61 довжини хвилі, є невидимими у відповідному діапазоні хвиль. Говорячи про зростаючий нуклеус, це означає, що агрегати, менші за 240 нм, лишаються невидимими. Подібний розмір відповідає білковому агрегату з молекулярною масою порядку  $10^6$ – $10^7$  кДа [31]. Подібно до інших наночасток, ці агрегати не осаджуються у водних розчинах, утворюючи свого роду нанорідини (nanofluids) [25].

**З наведених міркувань утворення мультимерних агрегатів може бути визнане одним з вагомих, якщо не чільним фактором, що обумовлюють імуногенність білкових препаратів [10].**

Існуюча ситуація ускладнюється дедалі ширшим впровадженням у клінічну практику біосимілярів – отриманих за спрощеною біотехнологією аналогів лікарських засобів, поданих на реєстрацію після закінчення дії патенту на оригінальний препарат [12]. Саме рівень імуногенності визнано критичним показником припустимості застосування препаратів інсуліну. При цьому варто підкреслити, що, хоча виявлення в складі препарату нанорозмірних  $\beta$ -складчастих мультимерів на стадії випуску не становить методичних ускладнень і може бути проведено за допомогою існуючих фізико-хімічних методів, здатність білкових молекул до конформаційних змін упродовж періоду зберігання та застосування робить рівень імуногенності препарату непередбачуваним [10, 24].

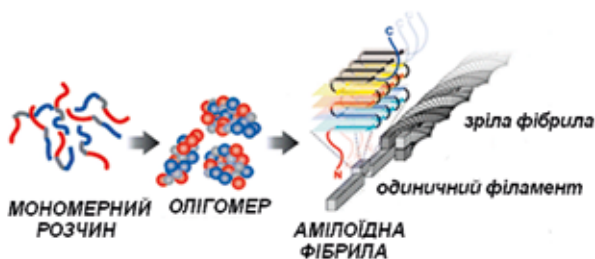


Рис. 4. Стадії формування  $\beta$ -структурованих білкових фібрил [27]

Існують різноманітні методи стабілізації білкових препаратів за рахунок створення стабілізованих комплексів, забезпечення полімерними наповнювачами від небажаних міжмолекулярних контактів, створення подібного до нативного рівня гідратації та багато інших [11]. Однак можливість автохтонного формування нанорозмірних мультимерних похідних лишає питання про імуногенність кінцевого продукту відкритим. Так, численні форми препаратів інсуліну містять у своєму складі іони цинку [12]. Це забезпечує перебування білкових молекул у стані високостабілізованого гексамеру під час зберігання та введення з повільною дисоціацією комплексу до мономерних молекул у кровообізі. При цьому, однак, рівень імуногенності препаратів інсуліну безпосередньо перед застосуванням лишається непередбачуваним [7, 24].

У подібному контексті варто розглянути провідні фактори, що сприяють утворенню імуногенних мультимерів, та можливі методичні підходи до запобігання обумовленим ними небажаним процесам. Перш за все, хоч і з певними застереженнями, видається імовірною **залежність схильності білка до агрегації від його молекулярної маси**. Подібна залежність обумовлена не стільки зростанням лабільності молекули зі зростанням маси, скільки методичними ускладненнями переведення рекомбінантних білків у функціонально активну конформацію. Це ускладнює її збереження і застосування.

Так, згідно з численними даними, після застосування замісної терапії автоімунні ускладнення гемофілії (розвиток інгібітора) спостерігають у 15–35% хворих на гемофілію А, обумовлену функціональним дефіцитом фактора VIII (молекулярна маса 330 кДа), і лише у 3–5% хворих на гемофілію В, обумовлену дефіцитом фактора IX (молекулярна маса 57 кДа) [3, 16, 17, 18, 23]. Тобто з певною обережністю можна припустити існування кореляції між молекулярною масою замісного препарату та обумовлених ним імуногенними ускладненнями. Не менш важливою обставиною є й амінокислотний склад білка, вірніше – наявність у його складі послідовностей, що сприяють формуванню  $\beta$ -складчастих структур. Саме завдяки подібному складу відносно низькомолекулярний інсулін став класичним об'єктом для моделювання процесів фібрилоутворення за умов *in vitro* [14, 26]. Ймовірно, з тих самих причин до наслідків введення сучасних рекомбінантних форм інсуліну належить розвиток локального амілоїдозу за місцем введення [24, 32]. Тобто інсулін, вірніше – його мультимерна форма, відіграє роль типового індуктора агрегації, подібного до різноманітних речовин, що застосовуються для моделювання амілоїдоутворення як за умов *in vitro*, так і *in vivo* [30].

До способів якщо не подолання, то хоча б запобігання проявам сформованої імунної реакції на замісні препарати належить застосування обхідних (шунтових) схем, що протягом останнього десятиріччя набуває дедалі ширшого поширення в разі лікування інгібіторних форм гемофілії [8]. За наявності імунної реакції на фактор VIII чи IX зсідання крові може бути досягнуто завдяки застосуванню рекомбінантного фактора VIIa (рис. 5). Цей фактор складається з двох невеликих (30 та 20 кДа) поліпептидних ланцюгів, з'єднаних між собою одним дисульфідним зв'язком, і містить активний протеолітичний центр. Щоправда, питання про те, якою мірою подібна структура захищена від агрегації під час отримання та зберігання та чи не призведе застосування подібного препарату до розвитку інгібітора

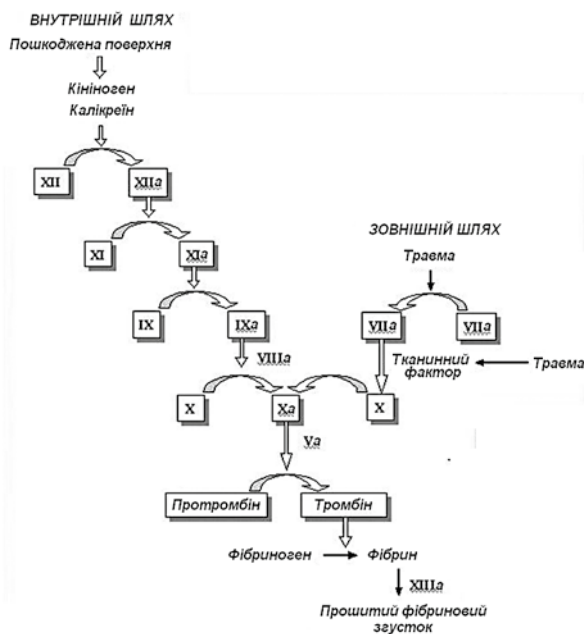


Рис. 5. Активційний каскад системи зсідання крові

вже на рівні активації фактора X, лишаються нез'ясованими.

## Висновки

Узагальнюючи наведений матеріал, можна заключити, що утворення імуногенних агрегатів становить істотно ускладнення під час застосування замісних білкових препаратів. Найдосконаліші методи формування структури білка, її стабілізації та виробничого контролю не захищають кінцевий препарат від автохтонного формування β-структурованих мультимерів упродовж зберігання

за непередбачуваних умов. Виявлення подібних домішок безпосередньо перед застосуванням хоча й можливе методично, однак потребує складного обладнання та на-вряд чи може бути впроваджене в практику навіть добре обладнаних лікарських установ.

Водночас мультимерні супрамолекулярні агрегати можуть бути відокремлені від основного пулу мономерного білка за допомогою досить простих методів ультрафільтрації. Подібні методи успішно використовують у лабораторній діагностиці. Так, ультрафільтраційне відокремлення конгофільних агрегатів покладено в основу їх кількісного визначення за прееклампації та групи захворювань, обумовлених порушенням обміну білка. Стерилізація розчинів за допомогою мікрофільтрації давно та успішно використовується в клінічній та лабораторній практиці. Застосування аналогічного недорогого обладнання з ультрафільтраційними мембранами може стати ефективним бар'єром проти формування імунної реакції на замісні білкові препарати.

## Список літератури

1. Гильчук П.В. Оценка методов ренатурации для промышленного получения рекомбинантных белков из теллец включения *Escherichia coli* в биологически активной форме. Биополимеры и клетка. 2004; 20 (3): 182–192.
2. Заболотный Д.И., Веревка С.В. Межмолекулярная координация белков в норме и при патологии / в кн.: Молекулярная патология белка. Под ред. Д.И. Заболотного. Київ.: Логос, 2008: 9–31.
3. Климонтов В.В., Мякина Н.Е. Инсулин гларгин: фармакокинетические и фармакодинамические основы клинического эффекта. Сахарный диабет. 2014; 4: 99–107.
4. Климонтов В.В., Мякина Н.Е. Биосимилляры аналогов инсулина: что мы должны о них знать. Эффективная фармакотерапия. 2015; 7: 28–35.
5. Параметаболизм как неспецифический модификатор супрамолекулярных взаимодействий в живых системах / В.А. Козлов, С.П. Сапожников, А.И. Шептухина, А.В. Голеньков. Вестник РАМН. 2015; 70 (4): 397–402.
6. Космач П.И. Иммуногенность инсулина. Пробл. Эндокринологии. 1974; 20 (4): 104–111.
7. Рыжова О.А., Мороз Т.П. Оценка условий госпитального хранения и применения лекарственных препаратов. Росс. мед. журн. 2018; 24(1): 35–40.
8. Стасишин А.В. Гемофилия, осложненная ингибитором / в кн.: Молекулярная патология белка. Под ред. Д.И. Заболотного. Київ.: Логос. 2008. С. 55–73.
9. Стасишин О.В., Веревка С.В. Аутоимунні ускладнення гемофілії: наявні та очікувані форми. Клінічна імунологія, алергологія та інфектологія. 2010; 9–10: 17–20.
10. Филиппова А.В., Чжао В., Колбин А.С. Оценка иммуногенного потенциала различных препаратов инсулина. Рос. мед. журн. 2018; 24 (1): 35–40.

11-33 список літератури — у редакції

## АГРЕГАЦИЯ БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ КАК ПРЕДПОСЫЛКА ИММУННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ

А.В. Стасишин<sup>1</sup>, В.В. Красивская<sup>1</sup>, Л.А. Матиуха<sup>2</sup>, Н.М. Ворошилова<sup>2,3</sup>, С.В. Веревка<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> ГУ «Институт патологии крови и трансфузионной медицины НАМН Украины»,

<sup>2</sup> Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца,

<sup>3</sup> ГУ «Институт отоларингологии им. проф. А.С. Коломийченко НАМН Украины»

### Резюме

Функциональный дефицит отдельных регуляционных белков составляет молекулярную основу многих хронических системных заболеваний. Возможность компенсации этой нехватки препаратами донорного, животного или трансгенного происхождения сделала возможным эффективное лечение заболеваний, до того считавшихся некурабельными. В то же время это привело к появлению комплекса осложнений, связанных с развитием иммунной реакции на введенные препараты и переносом этой реакции на собственные, и без того дефицитные, белки. Данная работа посвящена рассмотрению причин иммуногенности белковых препаратов на основе современных представлений об особенностях белковой структуры, механизмах и последствиях ее нарушения. Особое внимание уделено спонтанному формированию наноразмерных белковых агрегатов как ключевой причины иммуногенности белковых препаратов. Обсуждаются возможные предохранительные меры, методические подходы для предотвращения иммунизации.

**Ключевые слова:** рекомбинантные белки, иммуногенность, денатурация белков, агрегация.

## AGGREGATION OF PROTEIN DRUGS AS A PREREQUISITE FOR IMMUNE COMPLICATIONS

Stasyshyn O.V.<sup>1</sup>, Krasivska V.V.<sup>1</sup>, Matiukha L.O.<sup>2</sup>, Voroshylova N.M.<sup>2,3</sup>, Verevka S.V.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> State Institution «Institute of blood pathology and transfusion medicine of National Academy of Medical Sciences of Ukraine»

<sup>2</sup> Bogomolets National Medical University

<sup>3</sup> State Institution «O.S. Kolomiychenko Institute of Otolaryngology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine»

### Abstract

The functional lack of certain regulatory proteins is the molecular basis of numerous chronic systemic diseases. The possibility of the compensating of this deficiency by corresponding proteins of animals, donors, and transgenic origin made it possible to treat effectively the group of diseases, which were previously incurable. At the same time, the introduction of such preparation led to the appearance of the wide group of complications, caused by the development of immune response both to the injected drugs and to the own functionally deficient proteins. This work is devoted to the consideration of the causes of the immunogenicity of the protein preparations on the basis of modern ideas about the features of proteins' structure, the mechanisms and consequences of their violation. Particular attention is paid to the spontaneous formation of nano-scaled aggregates as to the key cause to the immunogenicity of the corresponding preparations. The possible approaches for the prevention of immunization are under discussion.

**Key words:** recombinant proteins, immunogenicity, protein denaturation, aggregation.