

Гаузе, ограничивающий возможность разным видам занимать одну экологическую нишу — есть основание предполагать, что формирование группы адгезивно-инвазивных *E.coli* происходило на стыке двух экологических ниш поверхности эпителия и просвета кишечника.

*Авторы благодарят за помощь в подготовке и выполнении исследования Лазорева В.Н., Шитикова Е.С. Работа выполнена при поддержке гранта РФФ №16-15-00258.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ahmed I., Roy B. C., Khan S. A. et al. Microbiome, metabolome and inflammatory bowel disease. *Microorganisms*. 2016, 4 (2): 20.
2. Baumgart M., Dogan B., Rishniw M. et al. Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *ISME J*. 2007, 1 (5): 403-418.
3. Carrière J., Darfeuille-Michaud A., Nguyen H. T. Infectious etiopathogenesis of Crohn's disease. *World J. Gastroenterol*. 2014, 20 (34): 12102-12117.
4. Comito D., Cascio A., Romano C. Microbiota biodiversity in inflammatory bowel disease. *Italian J. Pediatrics*. 2014, 40 (1): 1.
5. Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied Environmental Microbiology*. 2000, 66 (10): 4555-4558.
6. Liang X., Ji Y. Comparative analysis of staphylococcal adhesion and internalization by epithelial cells. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) protocols*. 2007, p. 145-151.
7. Martinez-Medina M., Garcia-Gil L.J. *Escherichia coli* in chronic inflammatory bowel diseases: An update on adherent invasive *Escherichia coli* pathogenicity. *World J, Gastrointest. Pathophysiol*. 2014, 5 (3): 213-227.
8. Martinez-Medina M., Aldeguer X., Lopez-Siles M. et al. Darfeuille-michaud a molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2009, 15 (6): 872-882.
9. Wood T.K., Barrios A.F.G., Herzberg M., Lee J. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2006, 72 (2): 361-367.

*Поступила 20.03.17*

Контактная информация: Городничев Р.Б.,  
119435, Москва, ул. Малая Пироговская, 1а

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*А.М.Кудряшова<sup>1</sup>, О.В.Борисова<sup>1</sup>, Н.А.Михайлова<sup>1</sup>, Д.В.Лоншаков<sup>2</sup>, А.В.Катлинский<sup>2</sup>*

### **ВЛИЯНИЕ МЕТОДОВ ИММОБИЛИЗАЦИИ ЭРИТРОПОЭТИНА НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ВЫЯВЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ IgG К чЭПО В СЫВОРОТКАХ КРОВИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ЖИВОТНЫХ**

<sup>1</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, <sup>2</sup>Биофармацевтическая компания ООО «Форт», Москва

*Цель.* Исследование влияния методов иммобилизации эритропоэтина на чувствительность выявления специфических IgG к человеческому эритропоэтину (чЭПО) в сыворотках крови экспериментальный животных. *Материалы и методы.* В работе использовали сыворотки крови кроликов и морских свинок, полученных после введения препаратов эритропоэтина. Схемы иммуноферментного метода включали варианты пассивной иммобилизации человеческого рекомбинантного эритропоэтина (чрЭПО) на планшете и два варианта иммунохимической иммобилизации: связывание биотинилированного чрЭПО в лунках планшета с пассивно иммобилизованным стрептавидином и связывание чрЭПО с пассивно иммобилизованными на планшетах антителами к эритропоэтину. *Результаты.* Показано, что иммунохимическая иммобилизация приводит к повышению чувствительности в диапазоне от 2 до 10 раз при выявлении антител к чЭПО по сравнению

с пассивной иммобилизацией. *Заключение.* Полученные результаты свидетельствуют о значительном влиянии метода иммобилизации чрЭПО на чувствительность выявления антител к чЭПО. При выявлении антител к нативным конформационным эпитопам иммунохимическая иммобилизация является предпочтительной.

Журн. микробиол., 2017, № 6, С. 49—55

Ключевые слова: сыворотки животных, твердофазный ИФА, антитела, эритропоэтин

*A.M.Kudryashova<sup>1</sup>, O.V.Borisova<sup>1</sup>, N.A.Mikhailova<sup>1</sup>, D.V.Lonshakov<sup>2</sup>, A.V.Katlinsky<sup>2</sup>*

## **EFFECT OF METHODS OF IMMOBILIZATION OF ERYTHROPOIETIN ON THE SENSITIVITY FOR THE DETECTION OF SPECIFIC IgG TO EPO IN EXPERIMENTAL ANIMALS SERA**

<sup>1</sup> Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, <sup>2</sup>Biopharmaceutical company LLC «Fort», Moscow, Russia

*Aim.* The study of the effect of the erythropoietin coating procedure on sensitivity using the same secondary detection methods to quantify anti-EPO IgG positive animal sera. *Materials and methods.* Sera from experimental animals — rabbits and guinea pigs — after rhEPO injection were used. The methods includes directly coated ELISA and two types of immunochemical immobilization: capturing biotinylated rhEPO on streptavidin coated microtiter plates and capturing rhEPO via a specific antibody. *Results.* Immunochemical rhEPO immobilization results in a sensitivity from 2 to 10 of magnitude higher than direct coating of rhEPO. *Conclusion.* Our findings show that the method of rhEPO immobilization to microtiter plates is a critical determinant for the sensitivity of ELISA used for measuring anti-EPO antibodies. Assays in which rhEPO was captured via a specific mAb, or in which biotinylated rhEPO was captured via streptavidin, are preferred to detect serum antibodies to native structural state.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 6, P. 49—55

Key words: serum of animals, ELISA, antibodies, erythropoietin

## **ВВЕДЕНИЕ**

Терапия препаратами эритропоэтина проводится при хронической почечной недостаточности, онкозаболеваниях, при трансплантации органов и эритропоэтиндефицитных анемиях. Определение специфических антител к терапевтическим препаратам эритропоэтина является необходимым этапом оценки иммуногенности в ходе доклинических и клинических исследований, а также имеет важное значение для диагностики полной аплазии красного костного мозга (ПАККМ), вызываемой при длительном применении препаратов эритропоэтина [6, 8, 9]. Разработаны и описаны разные платформы для определения антител к эритропоэтину. Наиболее часто используются твердофазный иммуноферментный анализ, электрохемилюминесцентный метод, методы радиоиммунопреципитации и поверхностного плазмонного резонанса [1, 11, 13]. Преимуществами твердофазного иммуноферментного анализа являются отработанная технология, приборная оснащённость клинических лабораторий, обеспечивающих высокую пропускную способность и относительно дешёвизну постановки метода.

Важнейшим фактором, определяющим чувствительность твердофазного иммуноферментного анализа, является концентрация активных связывающих сайтов на поверхности твёрдой фазы. При пассивной сорбции белковая мо-

лекула изменяет свою конформацию и, как следствие, может измениться ее способность к биоаффинному взаимодействию [3, 10]. Для сохранения активности иммобилизуемых молекул и достижения высокой чувствительности используют ряд модификаций твердофазного иммуноферментного анализа. На модели иммуноферментного анализа, в котором выявляемые антитела одним сайтом связывались с эритропоэтином, иммобилизованным на планшете, а вторым — с меченым эритропоэтином, обеспечивающим детекцию сигнала, показано, что повысить чувствительность выявления антител к эритропоэтину можно, заменив пассивную иммобилизацию антигена связыванием биотинилированного антигена на планшетах, несущих на своей поверхности стрептавидин [5]. Однако данная модификация твердофазного иммуноферментного метода не позволяет выявлять специфические IgG4 [12], наличие которых было установлено в сыворотках крови пациентов с подтвержденным диагнозом ПАКМ [2, 13].

В соответствии с вышеизложенным, задачей данного исследования было изучение влияния метода иммобилизации эритропоэтина на чувствительность непрямого твердофазного иммуноферментного метода, позволяющего выявлять все классы иммуноглобулинов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы: 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, стрептавидин (Сорбент-сервис, Москва). Для проведения ИФА использовались прозрачные 96-луночные планшеты (Costar). Эритропоэтин рекомбинантный человеческий (чрЭПО) предоставлен ООО «Форт», аффинно очищенные антитела кролика к эритропоэтину человека (ПАТ кролика к чЭПО, ООО «Протеиновый контур», Санкт-Петербург), антитела козы к IgG кролика (H+L), конъюгированные с пероксидазой (ThermoScientific), антитела кролика к IgG морской свинки, конъюгированные с пероксидазой (ThermoScientific).

Сыворотки крови экспериментальных животных (кроликов и морских свинок) предоставлены ООО «Форт». Сыворотки получены после введения животным препаратов эритропоэтина бета, конъюгированного с полиэтиленгликолем (ПЭГ-ЭПО, ООО «Форт») [7], и метоксиполиэтиленгликоль-эпоэтина бета (Мирцера, Hoffmann-La Roche Inc.) в течение 28 дней один раз в неделю подкожно (кролики) и внутривенно (кролики и морские свинки) в дозе 2,5 мкг/кг и 5 мкг/кг и последующего забора крови через 14 дней после последней инъекции (в каждую группу входили от 3 до 8 экспериментальных животных).

Результаты ИФА регистрировали на аппарате BioRadModel 680. Инкубацию планшетов проводили на термостатируемом планшетном встряхивателе (ELMI SkyLine) при 500 об/мин и температуре 37°C. После всех инкубаций проводили отмывку планшетов на планшетном промывателе (StatFax).

Получение препарата биотинилированного человеческого рекомбинантного эритропоэтина (Би-чрЭПО) проводили с использованием EZ-LinkSulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Thermo Scientific) при 20-кратном избытке биотина в соответствии инструкции производителя.

Выявление антител с пассивной иммобилизацией чрЭПО проводили путем внесения в лунки планшета по 100 мкл чрЭПО в концентрации 5 мкг/мл в 0,1 М карбонатно-бикарбонатном буфере (КББ), pH 9,6. Планшеты выдерживали в течение 19 — 22 часов при температуре (4 — 8)°C и на 1 час вносили блокирующий раствор — 0,02 М фосфатный буферный раствор pH 7,2, содержащий 5% сахарозы, 0,09% казеината натрия, 0,05% Tween 20. Далее вносили

поликлональные антитела кролика к чЭПО или образцы сывороток в разведении 1:50 в 0,02 М фосфатном буферном растворе pH 7,2, содержащем 0,2% БСА, 0,05% Tween 20 (PP). После инкубирования в течение 45 минут и отмывки вносили соответственно по 100 мкл конъюгированных с пероксидазой антител козы к IgG кролика (H+L) либо антител кролика к IgG морской свинки в разведении 1:15 т. Повторяли этап инкубирования и вносили по 100 мкл 33 мМ цитратного буферного раствора pH 4,0, содержащего 0,01% перекиси водорода и 0,5 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Через 15 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2N серной кислоты, измеряли оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 680 нм.

При выявлении антител непрямой метод с иммобилизацией биотинированного чрЭПО в лунки планшета вносили по 100 мкл стрептавидина в концентрации 10 мкг/мл в КББ. Планшеты выдерживали в течение 19 — 22 часов при температуре (4 — 8)°С. Далее вносили по 100 мкл Би-чрЭПО в PP в концентрации 0,5 мкг/мл. После инкубирования в течение 45 минут вносили по 100 мкл 0,02М фосфатного буферного раствора pH 7,2, содержащего 5% обезжиренного сухого молока (AppliChem) и 0,05% Tween 20. Стадию блокировки проводили в течение 45 минут. Внесение образцов сывороток и последующие процедуры проводили аналогично выявлению антител к чЭПО с проведением пассивной иммобилизации чрЭПО.

При выявлении антител с иммунохимическим связыванием чрЭПО в лунки планшета вносили поликлональные антитела кролика в 0,02 М фосфатном буферном растворе, pH 7,2, в концентрации 5 мкг/мл. Планшеты выдерживали в течение 19 — 22 ч при температуре (4 — 8)°С. После инкубации вносили блокирующий раствор, указанный при пассивной иммобилизации чрЭПО. Далее вносили по 100 мкл чрЭПО в концентрации 0,5 мкг/мл в PP и инкубировали в течение 90 минут. Образцы сывороток вносили по 100 мкл в разведении 1:50 в 0,02 М фосфатном буферном растворе pH 7,2, содержащем 5% сыворотки кролика, 0,05% Tween 20 и инкубировали в течение 60 минут. Затем вносили по 100 мкл соответствующего конъюгата в PP в разведении 1:90 т. и инкубировали в течение 30 минут. Последующие процедуры проводили аналогично выявлению антител к чЭПО с проведением пассивной иммобилизации чрЭПО.

В каждом случае проводили подбор параметров ИФА с целью достижения максимальной чувствительности и специфичности. Чувствительность определения антител в сыворотках крови экспериментальных животных оценивали путем сравнения значения индексов позитивности анализируемых сывороток, определяемых как отношение ОПобразца/ОПпорог., где ОПпорог. = ОПср.К + 3σ, где ОПср.К — среднее арифметическое значение регистрируемого сигнала для нормальной пулированной сыворотки экспериментальных животных (6 — 10 повторов), σ — стандартное отклонение.

Результаты анализировали с помощью программного обеспечения OriginPro 9.1 (64-bit) SR3 b87 (OriginLab Corporation). Результаты для каждой группы экспериментальных животных выражали как среднее арифметическое ± стандартное отклонение. Критерий Манна-Уитни использовали для сравнения результатов, полученных для разных условий эксперимента. Величина  $p \leq 0,05$  рассматривалась как статистически значимая.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение уровня антител к чЭПО в сыворотках кроликов проводили непрямой твердофазным иммуноферментным методом как при пассивной

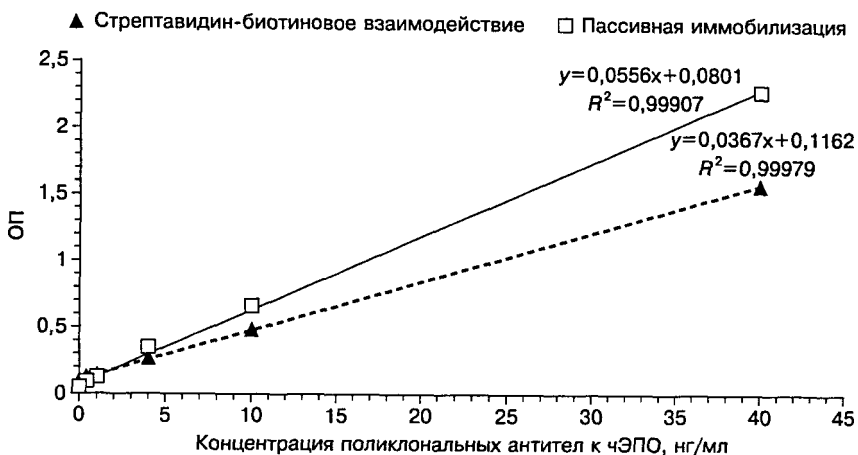


Рис. 1. Калибровочные графики, полученные для ИФА с пассивной иммобилизацией чрЭПО и для ИФА при стрептавидин-биотиновом взаимодействии.

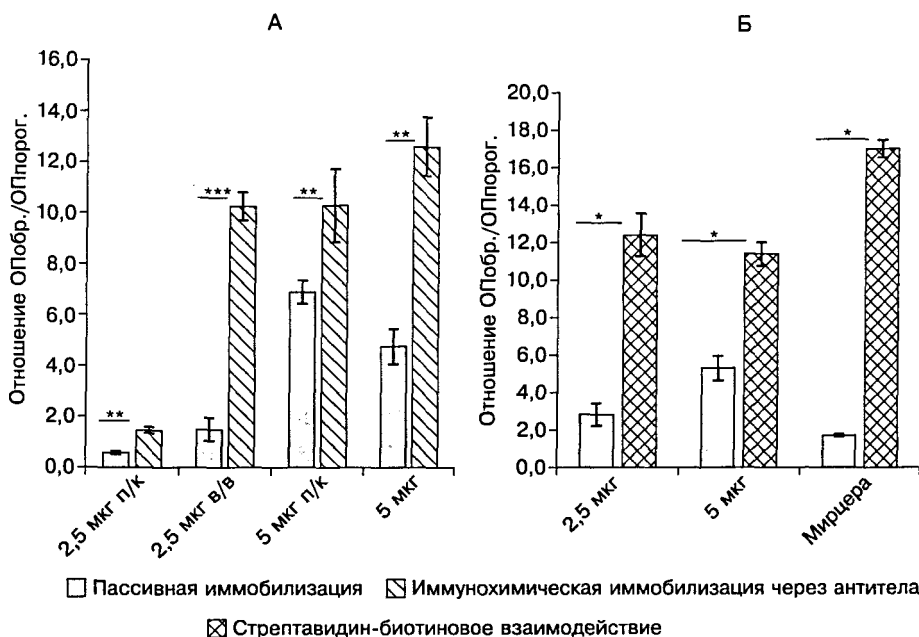


Рис. 2. Уровень антител к чЭПО в сыворотках морских свинок (А) при подкожном (п/к) и внутривенном (в/в) введении и кроликов (Б) при постановке разных вариантов ИФА.

\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$  и \*\*\* $p \leq 0,001$  для критерия Манна-Уитни в каждой группе животных.

иммобилизации эритропоэтина в лунках иммуносорбента, так и при связывании биотинилированного чрЭПО на планшете с предварительно иммобилизованным стрептавидином

На первом этапе сравнивали калибровочные графики для двух видов ИФА, полученные с использованием в качестве калибратора антител кролика к эритропоэтину человека (рис. 1).

Тангенсы угла наклона линейного участка калибровочного графика к оси концентрации в координатах концентрация/поглощение характеризуют чувствительность метода (изменение регистрируемого сигнала на единицу из-

менения концентрации). Результаты свидетельствуют о более высокой чувствительности выявления поликлональных антител к эритропоэтину при пассивной иммобилизации. Иная картина наблюдается при определении уровня антител в сыворотках 3 групп кроликов, которым подкожно вводили препараты эритропоэтина — ПЭГ-ЭПО и Мирцера (рис. 2). Полученные данные свидетельствуют о том, что иммобилизация чрЭПО через стрептавидин-биотиновое взаимодействие приводит к повышению чувствительности. Особенно выражено этот эффект проявлялся при выявлении антител у экспериментальных кроликов, которым вводили препарат Мирцера.

Сравнение уровня антител к чЭПО в сыворотках морских свинок проводили методами ИФА с пассивной иммобилизацией чрЭПО и с иммунохимической иммобилизацией чрЭПО на планшете с иммобилизованными поликлональными антителами кролика к чЭПО.

На рис. 2 представлены данные по определению индекса позитивности для сывороток морских свинок, показывающие, что при иммунохимической иммобилизации чрЭПО была достигнута более высокая чувствительность при определении уровня антител к эритропоэтину. Результаты показали, что сыворотки, в которых при пассивной иммобилизации чрЭПО не обнаруживаются специфические антитела, в условиях использования метода с иммунохимической иммобилизацией эритропоэтина выявляются как положительные.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о значительном влиянии метода иммобилизации чрЭПО на чувствительность выявления антител к чЭПО. Иммунохимическая иммобилизация приводит к повышению чувствительности при выявлении антител к эритропоэтину в сыворотках крови экспериментальных кроликов и морских свинок. Как уже отмечалось, особенно ярко эффект повышения чувствительности проявляется при выявлении антител у экспериментальных кроликов, которым вводили препарат Мирцера. Более того, если сравнивать иммуногенность препаратов ПЭГ-ЭПО и Мирцеры в части генерации антител к чЭПО, то полученный результат при использовании двух типов иммуносорбентов оказывается противоположным: при пассивной иммобилизации чрЭПО обнаруживается большее количество антител к препарату ПЭГ-ЭПО, тогда как при использовании иммунохимической иммобилизации — к препарату Мирцера. Таким образом, метод иммобилизации чрЭПО на планшете не только влияет на чувствительность выявления антител в сыворотках экспериментальных животных, но использование ненадлежащего метода может привести к неверным представлениям об иммуногенности терапевтических белковых препаратов.

С другой стороны, более высокая чувствительность выявления поликлональных афинно очищенных антител кролика к эритропоэтину наблюдалась при пассивной иммобилизации, что может свидетельствовать о разном характере коммерческих антител к чЭПО и антител, находящихся в исследуемых сыворотках кроликов. Разница в чувствительности методов, вероятно, определяется конформацией иммобилизованного антигена. Пассивная сорбция может приводить к изменению конформации чрЭПО и соответственно к недоступности ряда эпитопов для связывания со специфическими антителами к конформационным эпитопам. При получении поликлональных антител процедура иммунизации обычно проводится в присутствии полного адьюванта Фрейнда, и, возможно, это вызывает частичную денатурацию белка. Кроме того, процесс очистки поликлональных антител проводился методом аффинной хроматографии, также включающей стадии денатурирующего воздействия

на белок. Соответственно значительную часть пула поликлональных антител могут составлять антитела к ненативным эпитомам, подобным тем, что формируются при пассивной иммобилизации антигена. Исследуемые сыворотки экспериментальных животных получены в условиях, когда велика вероятность образования антител к нативным эпитомам, и предпочтительным методом выявления антител является использование иммуносорбента с иммунохимически иммобилизованным чрЭПО. По литературным данным в сыворотках пациентов с полной аплазией красного костного мозга преимущественно были обнаружены антитела к нативным эпитомам эритропоэтина [4], что указывает на необходимость использования метода с иммунохимической иммобилизацией антигена при определении специфических антител к эритропоэтину у пациентов, проходящих терапию препаратами эритропоэтина.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Barger T.E., Kuck A.J., Chirmule N. et al. Detection of anti-ESA antibodies in human samples from PRCA and non-PRCA patients: an immunoassay platform comparison. *Nephrol Dial Transplant.* 2012, 27: 688-693.
2. Barger T.E., Wrona D., Goletz T.J. et al. A detailed examination of the antibody prevalence and characteristics of anti-ESA antibodies. *Nephrol. Dial Transplant.* 2012, 27 (10): 3892-3899.
3. Butler J.E. Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assays and other solid phase immunoassays. *Methods Mol. Med.* 2004, 94: 333-372.
4. Casadevall N., Nataf J., Viron B. et al. Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *New Engl. J. Med.* 2002, 346: 469-475.
5. Gross J., Moller R., Henke W. et al. Detection of anti-EPO antibodies in human sera by a bridging ELISA is much more sensitive when coating biotinylated rhEPO to streptavidin rather than using direct coating of rhEPO. *J. Immunol. Methods.* 2006, 313 (1-2): 176-182.
6. Herrington W., Wieser C., Rosenkranz A.R. Pure red cell aplasia after treatment of renal anaemia with epoetin theta. *Clin. Kidney J.* 2013, 6 (5): 539-542.
7. Lonshakov D. V., Sheremet'ev S. V., Belosludtseva E. M. et al. Synthesis of 4-aminobenzoic acid esters of polyethylene glycol and their use for pegylation of therapeutic proteins. *RSC Adv.* 2015, 5 (53): 42903-42909.
8. Macdougall I.C., Casadevall N., Locatelli F. et al. Incidence of erythropoietin antibody-mediated pure red cell aplasia: the prospective immunogenicity surveillance registry (PRIMS). *Nephrol Dial Transplant.* 2015, 30 (3): 451-460.
9. Macdougall I.C., Roger S.D., de Francisco A. et al. Antibody-mediated pure red cell aplasia in chronic kidney disease patients receiving erythropoiesis stimulating agents: new insights. *Kidney Int.* 2012, 81: 727-732.
10. Rabe M., Verdes D., Seeger S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Advances Colloid Interface Sci.* 2011, 162 (1-2): 87-106.
11. Shin S.K., Ha S.K., Lee K.W. et al. Application of a bridging ELISA for detection of anti-erythropoietin binding antibodies and a cell-based bioassay for neutralizing antibodies in human sera. *J. Pharm. Biomed Anal.* 2010, 52: 289-293.
12. Van Der Zee J.S., Van Swieten P., Aalberse R.C. Serologic aspects of IgG4 antibodies. II. IgG4 antibodies form small, nonprecipitating immune complexes due to functional monovalency. *J. Immunol.* 1986, 137: 3566-3571.
13. Weeraratne D.K., Kuck A.J., Chirmule N. et al. Measurement of anti-erythropoiesis stimulating agent IgG4 antibody as an indicator of antibody-mediated pure red cell Aplasia. *Clin. Vac. Immunol.* 2013, 20 (1): 46-51.

*Поступила 27.07.17*

Контактная информация: Кудряшова Александра Михайловна,  
109044, Москва, 1-я Дубровская ул., 15, р.т. (495) 674-54-97