

УДК [619:616-097+619:615.33]:619:579.842.11
<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2022-1-31-36>

Якубовский С.М., научный сотрудник
Насонов И.В., доктор ветеринарных наук, профессор
Кныш Н.В., кандидат ветеринарных наук
Радюш И.С., кандидат ветеринарных наук, доцент

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского», г. Минск

СИНТЕЗ КОНЬЮГАТОВ АНТИТЕЛО-АНТИБИОТИК ДЛЯ БОРЬБЫ С БАКТЕРИАЛЬНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

Резюме

Предложен способ получения конъюгатов антитело-антибиотик с доксициклином, иммунокомпетентных к *Escherichia coli*. Иммуноглобулины яичного желтка кур, иммунизированных кишечной палочкой, были конъюгированы с антибиотиком с использованием глутарового альдегида в качестве сшивающего реагента. За реакцией конъюгации следили спектрофотометрически и выявили образование отчетливых полос поглощения в ультрафиолетовых областях.

Кинетический анализ образования конъюгатов методом Гуггенгейма показал, что реакция конъюгации подчиняется кинетике реакций первого порядка. Константа скорости равнялась $0,77 \text{ мин}^{-1}$. Период полупревращения иммуноглобулинов при конъюгации с глутаровым альдегидом составил около 1 мин. Реакция протекала быстро в водном растворе при комнатной температуре. Молярное соотношение доксициклин : антитело в конъюгате составляло 2:1.

Ключевые слова: антитела, иммуноглобулины яичного желтка, антитело-антибиотик, конъюгаты, доксициклин.

Summary

Design of antibody-antibiotic conjugates with doxycycline immunocompetent to *Escherichia coli* is proposed. The egg yolk immunoglobulins from hens immunized with *Escherichia coli* have been conjugated with the antibiotic using the glutaraldehyde as the crosslinking reagent. The reaction of conjugation was followed spectrophotometrically and revealed the formation of distinct absorption bands in ultraviolet regions. The kinetic analysis of forming the conjugates by the Guggenheim method showed that the conjugation reaction obeyed the kinetics of the first-order reactions. The velocity constant equaled $0,77 \text{ min}^{-1}$. The half-conversion period of immunoglobulins during conjugation with glutaraldehyde was about 1 min. The reaction was rapid in aqueous solution at room temperature. The molar ratio of doxycycline : antibody in the conjugate was 2:1.

Keywords: antibodies, egg yolk immunoglobulins, antibody-antibiotic, conjugates, doxycycline.

Поступила в редакцию 22.04.2022 г.

ВВЕДЕНИЕ

Широкое использование антибиотиков для борьбы с бактериальными инфекциями, а также применение антибиотиков в качестве кормовых добавок с целью профилактических мероприятий в животноводстве привело к феномену глобальной резистентности бактерий к антибиотикам. Причем в этой борьбе бактерии одерживают победу, опережая разработчиков антибактериальных препаратов. Хотя скорость распространения резистентных бактерий по сравнению с пандемией бактериальных ин-

фекций значительно меньше, тем не менее, это явление приобретает характер мировой проблемы как в области здравоохранения, так и в животноводстве [6].

Одной из наиболее перспективных стратегий для преодоления резистентности является целенаправленная доставка антибиотика непосредственно в очаг инфекции. Использование конструкций конъюгатов антибиотиков с антителами, специфичными к определенным бактериям, является эффективным способом решения данной проблемы. Более того, сочетанное

действие составных компонентов этих конструкций на бактерии обеспечивает синергичное антибактериальное действие антител и антибиотиков [4, 9].

В настоящей работе в качестве антител использовали антиген-специфичные желточные иммуноглобулины кур (IgY) к *Escherichia coli*. Большинство штаммов *Escherichia coli* устойчивы ко многим маркетинговым антибиотикам для кур, включая цефрадин, тетрациклины, хлорамфеникол, аминогликозиды, бета-лактамы антибиотиков и сульфаниламиды. Антибиотики выбираются на основе проявления клинических признаков заболевания и тестирования бактериального изолята на чувствительность к их бактерицидному действию.

Несмотря на то, что многие комменсальные кишечные палочки не являются патогенными, некоторые могут приобретать факторы вирулентности посредством трансдукции генов вирулентности, опосредованной плазмидами. Птичья патогенная кишечная палочка вызывает такое тяжелое заболевание, как колибациллез. Манифестация колибациллеза может иметь различные клинические формы: септицемия, кишечная, бронхолегочная или смешанная. Птицы с сопутствующими заболеваниями, такими как микоплазмоз, инфекционный бронхит, болезнь Ньюкасла, геморрагический энтерит, бордетеллез индейки, а также из-за неблагоприятных экологических факторов особенно подвержены заболеванию колибациллезом, что приобретает характер пандемии и наносит существенный экономический ущерб птицеводству во всем мире [5].

Использование птиц в качестве источника антител в форме яичных иммуноглобулинов к различным антигенам приобрело широкое распространение в силу филогенетических различий между птицами и млекопитающими. Яичные иммуноглобулины не взаимодействуют с системой комплемента млекопитающих, а также не вступают в перекрестные реакции с иммуноглобулинами IgG млекопитающих [2]. Таким образом, применение яичных иммуноглобулинов в качестве несущей платфор-

мы для фармакологических препаратов исключает развитие побочных иммуногенных реакций организма.

Для создания конъюгата в качестве антибиотика использовали доксициклин, эффективность которого доказана при экспериментальном колибациллезе цыплят-бройлеров [5].

В основе молекулярного механизма образования конъюгатов между белками, а также конъюгированных белков с молекулами других классов химических соединений лежит образование ковалентных связей между различными функциональными группами сшивающего агента и свободными химическими сульфгидридными, амино- и карбоксильными группами белков.

Образование конъюгатов зависит от природы сшивающего агента. Глутаровый альдегид представляет собой мягкий сшивающий агент, поскольку реакция конъюгации протекает в водном буферном растворе в условиях, близких к физиологическим значениям pH, ионной силе и температуре. Глутаровый альдегид образует амидные связи со свободными ξ -аминогруппами лизиновых остатков белков.

Яичные иммуноглобулины – это водорастворимые белки, которые локализуются в желтке куриных яиц. Как правило, поверхность белка, обращенная к водной среде, содержит множество остатков лизина из-за высокой полярности аминогруппы. Следовательно, с учетом водорастворимого характера яичных иммуноглобулинов эти антитела отличаются высоким содержанием аминокислот и легко могут вступать в реакции белковых сшивок с глутаровым альдегидом. Считается, что лизиновые остатки не влияют на биологическую активность белков, следовательно, можно ожидать, что не будут влиять на аффинные и эффекторные свойства антител.

Целью нашей работы явилось получение конъюгированных с антибиотиком антиген-специфичных желточных иммуноглобулинов к *Escherichia coli* для профилактики лечения колибактериозов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Источником яичных иммуноглобулинов являлись куры яйценокских пород, гипериммунизированных инактивированной культурой клеток *Escherichia coli* [1]. Иммуноглобулины выделяли из желтков яиц с использованием системы органических растворителей [3]. Конъюгаты получали путем образования ковалентных сшивок между молекулами иммуноглобулинов и

доксициклином с использованием глутарового альдегида в качестве сшивающего агента [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Образование конъюгатов яичных иммуноглобулинов с глутаровым альдегидом регистрировали методом дифференциальной спектроскопии в ультрафиолетовом диапазоне длины волн.

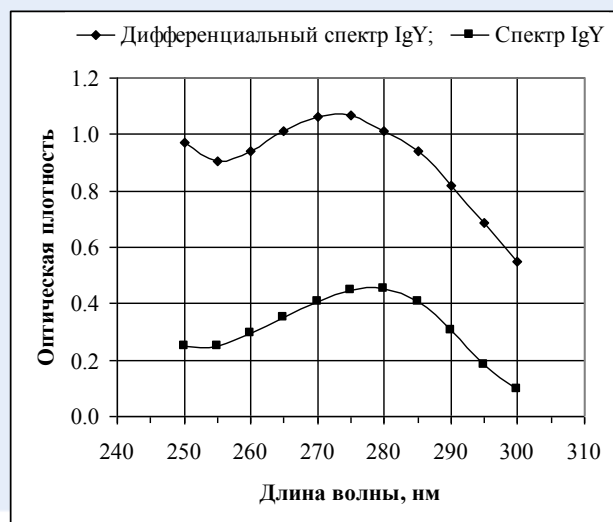


Рисунок 1. – Дифференциальный УФ-спектр конъюгата IgY с глутаровым альдегидом и УФ-спектр поглощения нативных IgY

Как видно из рисунка 1, после обработки иммуноглобулинов глутаровым альдегидом наблюдалось увеличение оптической плотности в диапазоне длины волн 250–300 нм. Оптическая плотность при характеристической длине волны для белков 280 нм значительно увеличивалась, и наблюдался сдвиг УФ-спектра поглощения на 5 нм в коротковолновую область. При этом максимум поглощения отмечался в диапазоне 260–275 нм. Можно заключить, что критерием образования конъюгата глутарового альдегида с белком является увеличение оптических плотностей УФ-спектров в исследуемом диапазоне длины волн и выраженный гипсохромный эффект (коротковолновый сдвиг) в спектре белка. Полученные результаты согласуются с аналогичными данными других исследователей, полученными при изучении взаимодействия глутарового альдегида с различными белками [8].

Обратимость реакции между глутаровым альдегидом и белками исследовали путем разбавления аликвот реакционных смесей, которым давали уравниваться в течение 24 ч, с последующим наблюдением за спектрами разбавленных растворов в течение следующих 24 ч при 270 нм. График зависимости оптической плотности комплекса глутаровый альдегид-иммуноглобулины через 24 ч после разбавления показан на рисунке 2 и имеет линейный характер. Если бы обратная реакция протекала в заметной степени, различные сдвиги положения равновесия (в направлении реагентов) происходили бы при различных разведениях, что приводило бы к систематическому искривлению графика. Такого эффекта не наблюдалось, и мы приходим к выводу, что в наших условиях скорость обратной реакции ничтожно мала.

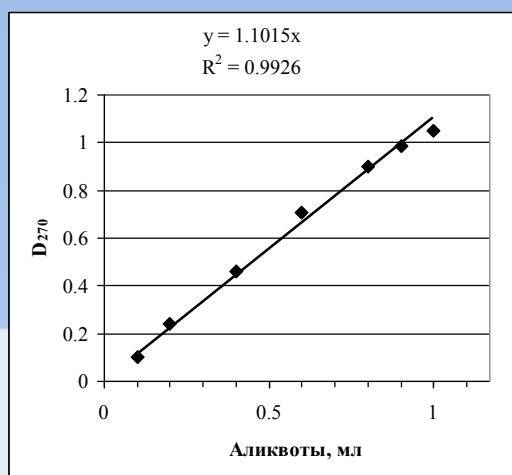


Рисунок 2. – Зависимость оптической плотности от разведения конъюгата IgY с глутаровым альдегидом через 24-часовой период выжидания после разведения конъюгата

Полученные данные указывают, что продукт реакции, формирующийся между глутаровым альдегидом и иммуноглобулинами, не диссоциирует при разбавлении реакционной смеси, поэтому можно заключить, что реакция носит необратимый характер. Необратимость реакции свидетельствует о формировании прочной ковалентной аминок-пептидной химической связи глутарового альдегида с иммуноглобулинами. Это свойство глутарового альдегида дает основание для его дальнейшего использования в качестве спейсерной молекулы для получения целевых конъюгатов иммуноглобулинов с антибиотиками.

Анализ константы скорости реакции методом Гуггенгейма [7] показал, что реакция конъюгации подчиняется реакциям первого порядка. На рисунке 3 представлены результаты измерения оптических плотностей при 265 нм, характерном максимуме конъюгатов глутарового альдегида с белками, через равные интервалы времени, в частности с интервалом 5 с. Рисунок 3 представляет графический анализ константы скорости по белку в координатах Гуггенгейма. Разницу оптических плотностей вычисляли для каждого интервала времени и рассчитывали натуральный логарифм разницы оптических плотностей.

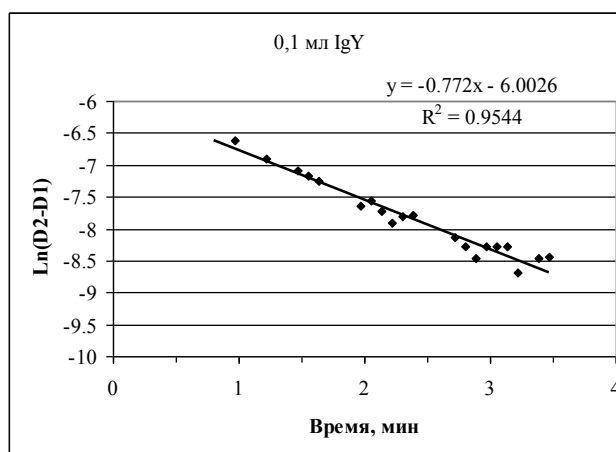


Рисунок 3. – График Гуггенгейма для реакции между яичным иммуноглобулином и глутаровым альдегидом

Графическая зависимость логарифма разницы оптических плотностей от времени реакции согласно Гуггенгейму описывается уравнением скорости реакции:

$$\ln(D_2 - D_1) = -kt + \text{const},$$

где D_2 – оптическая плотность, регистрируемая в момент времени реакции (t , мин);

D_1 – оптическая плотность соответствующая предыдущему интервалу времени регистрации реакции (t , мин);

\ln – натуральный логарифм разницы оптических плотностей;

k – константа скорости реакции (мин^{-1});

t – время реакции (мин);

const – постоянный член уравнения Гуггенгейма.

Путем аппроксимации данной зависимости с помощью линейной регрессии (рисунок 3) находим наклон линии регрессии, равный константе скорости ($k = \text{мин}^{-1}$) реакции взаимодействия глутарового альдегида с иммуноглобулинами. Константа скорости составила $0,77 \text{ мин}^{-1}$.

Поскольку представленная зависимость Гуггенгейма линейна, а реакция необратима, следует вывод, что константа скорости является константой скорости реакции первого порядка. Важным следствием из анализа Гуггенгейма является вывод о независимости периода полупревращения от начальной концентрации исходного вещества для реакций первого порядка. При этом период полупревращения обратно пропорционален константе скорости: $T_{1/2} = \ln 2/k$.

Из величины полученной константы скорости мы рассчитали период полупревращения иммуноглобулинов при конъюгации с глутаровым альдегидом. Величина этого периода составила около 1 мин.

Таким образом, для полноты протекания реакции требуется время реакции не менее 20 мин, что соответствует 20 периодам полупревращения.

На следующем этапе работы были синтезированы конъюгаты антител с антибиотиком доксициклином. Синтез конъюгатов осуществляли при молярном соотношении компонентов реакционной смеси имму-

ноглобулины : доксициклин : глутаровый альдегид, равном 1: 62 : 28571. Реакцию конъюгации проводили в фосфатном буфере (0,1 М, рН 7,2) в течение 24 ч при перемешивании на магнитной мешалке. Конечный продукт очищали от низкомолекулярных компонентов методом диализа с использованием целлюлозной полупроницаемой мембраны с молекулярной массой отсечения 14 кДа. Диализ проводили против фосфатного буфера того же состава в течение 24 ч с 4-кратной сменой раствора. Для оценки состава конъюгата использовали спектрометрический анализ спектров конъюгатов в ультрафиолетовой области при длине волн 200–400 нм, регистрируемых с шагом 5 нм.

Как видно из рисунка 4, регистрируемые спектры первичных компонентов и продукта реакции конъюгации иммуноглобулинов с доксициклином существенно различаются и характеризуются наличием специфических максимумов поглощения в спектрах поглощения. Оптические плотности конъюгатов антитело-антибиотик значительно увеличивались по сравнению с оптическими плотностями в спектре иммуноглобулинов. При реакции конъюгации иммуноглобулинов с глутаровым альдегидом наблюдается гипсохромный эффект: сдвиг спектра в синюю область. Как упоминалось выше, гипсохромный эффект является характерной чертой для конъюгации глутарового альдегида с различными белками. Эта реакция обусловлена наличием в структуре доксициклина свободной аминогруппы, которая взаимодействует с альдегидной группой глутарового альдегида. Согласно сравнительным данным спектров первичных компонентов и конъюгата молярное соотношение доксициклин : иммуноглобулины в конъюгате, рассчитанное из отношения величин оптической плотности при 280 нм, составило 2:1.

Дальнейшие исследования будут направлены на изучение активности синтезированных конъюгатов иммуноглобулинов с доксициклином по отношению к *Escherichia coli* методом ИФА.

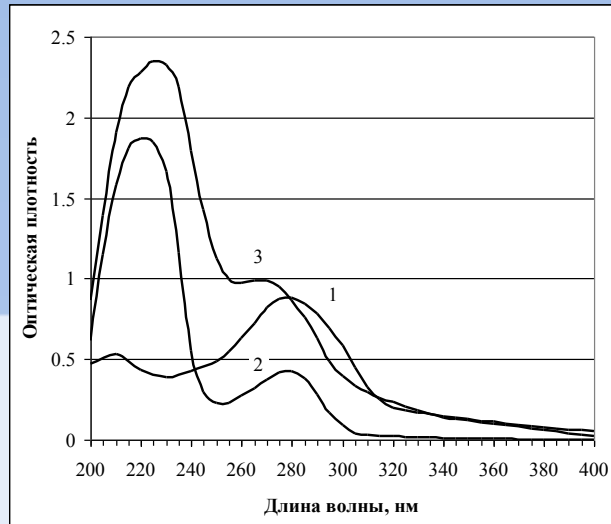


Рисунок 4. – УФ-спектры поглощения доксициклина с глутаровым альдегидом (1), иммуноглобулинов IgY (2), конъюгата иммуноглобулинов IgY с доксициклином (3)

ВЫВОДЫ

1. Глутаровый альдегид является оптимальным реагентом для синтеза конъюгатов доксициклина с яичными иммуноглобулинами кур.
2. Необратимый характер реакции

конъюгации свидетельствует об образовании прочной ковалентной связи между иммуноглобулинами и доксициклином.

3. Молярное соотношение доксициклин : яичные иммуноглобулины в составе конъюгата составило 2:1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гипериммунизация кур яйценоских пород для получения специфических к *Escherichia coli* желточных иммуноглобулинов / И. В. Насонов [и др.] // Эпизоотология Иммунология Фармакология Санитария. – 2021. – № 2. – С. 26–30.
2. Каплин, В. С. IgY-технологии в медицине. Лечение и профилактика неинфекционных заболеваний / В. С. Каплин, О. Н. Каплина // Международные обзоры: клиническая практика и здоровье. – 2018. – № 3. – С. 10–21.
3. Получение трансовариальных иммуноглобулинов при создании новых ветеринарных био-препаратов / Д. С. Борисовец [и др.] // Эпизоотология Иммунология Фармакология Санитария. – 2021. – № 2. – С. 31–39.
4. Cavaco, M. The Use of Antibody-Antibiotic Conjugates to Fight Bacterial Infections / M. Cavaco, M. A. R. B. Castanho, V. Neves // *Front. Microbiol.* – 2022. – 13:835677. – DOI: 10.3389/fmicb.2022.835677.
5. Comparative efficacy of doxycycline and flumequine against experimentally induced colibacillosis in broiler chicks / H. Akbar [et al.] // *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health.* – 2009. – Vol. 1 (2). – P. 17–22.
6. Christensen, H. New strategies to prevent and control avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) / H. Christensen, J. Bachmeier, M. Bisgaard // *Avian Pathology.* – 2020. – DOI:10.1080/03079457.2020.1845300.
7. Cleland, R. L. Guggenheim exponential method for unequal intervals / R. L. Cleland // *Analytical chemistry.* – 1970. – Vol. 42(6). – P. 675–676.
8. Hopwood, D. The reaction between glutaraldehyde and various proteins. An investigation of their kinetics / D. Hopwood // *Histochemical J.* – 1970. – № 2. – P. 137–150.
9. Mariathasan, S. Antibody-Antibiotic Conjugates : A Novel Therapeutic Platform against Bacterial Infections / S. Mariathasan, M.-W. Tan // *Trends in Molecular Medicine.* – 2017. – Vol. 23(2). – P. 135–149.