

Понимание сущности механизма действия высокоразбавленных биологических препаратов

По материалам оригинальной публикации: *Tarasov S.A., Gorbunov E.A., Don E.S., Emelyanova A.G., Kovalchuk A.L., Yanamala N., Schleker A.S.S., Klein-Seetharaman J., Groenestein R., Tafani J-P., van der Meide P., Epstein O.I. Insights into the mechanism of action of highly diluted biologics // The Journal of Immunology. – 2020. – Vol.205, issue 5. – P.1345-1354. doi: 10.4049/jimmunol.2000098*

Терапевтическое использование антител в онкологии, лечении аутоиммунных заболеваний, трансплантации и других областях является одним из основных достижений биофармацевтики 20-го века. Более широкое применение препаратов на основе антител ограничено из-за высокой стоимости их производства и частых побочных эффектов. В частности, клиническое применение антител к ИФН- γ с целью воздействия на иммунный ответ было признано неудачным. Одним из перспективных подходов к преодолению этих ограничений является использование высоких разведений антител, которые получают путем постепенного снижения концентрации антител до крайне низкого уровня. Эта технология была использована при создании группы препаратов для лечения различных патологий, включая инфекционные заболевания, эндокринные нарушения, урогенитальную дисфункцию и др.

Ранее была показана эффективность высоких разведений антител к интерферону гамма (ВР-АТ-ИФН- γ) в отношении гриппа и других респираторных инфекций в различных доклинических и клинических исследованиях. На сегодняшний день уже изучена способность ВР-АТ-ИФН- γ регулировать функциональную активность и продукцию эндогенных интерферонов, модулировать иммунный ответ и влиять на уровень естественных циркулирующих антител к ИФН- γ . Физико-химические свойства ВР-АТ-ИФН- γ изучались методами динамического рассеяния света, кондуктометрии, рН-метрии и тензиометрии, с помощью которых было показано, что водные растворы высоких разведений антител представляют собой самоорганизующиеся дисперсные системы с нанообъектами и могут содержать агрегаты исходных антител, ассоциированных с газовыми нанопузырьками, которые остаются в высоких разведениях благодаря эффекту флотации.

В данном исследовании мы приводим доказательства механизма действия ВР-АТ-ИФН- γ . С помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопии) высокого разрешения в жидкостях показано, что препарат вызывает конформационные

изменения в молекуле ИФН- γ (исследование проводилось в Университете Питтсбурга, США). ЯМР-спектроскопия имеет преимущества перед другими методами исследования структуры белков (рентгеновской кристаллографией и криоэлектронной микроскопией), т.к. позволяет обнаружить переходные взаимодействия между лигандами и белками, а именно химические сдвиги ядер, таких, например, как протон и азот. В качестве контроля мы использовали плацебо, где вода без антител к ИФН- γ подвергалась той же обработке, что и образцы, содержащие антитела. Спектры для ИФН- γ в присутствии ВР-АТ-ИФН- γ или плацебо, соответственно, регистрировались в тех же условиях, что и для ИФН- γ без добавок. 1D-протонный ЯМР-спектроскопический анализ ИФН- γ в присутствии и отсутствии ВР-АТ-ИФН- γ по ряду пиков указывает на наличие изменений в ближайшем окружении как в основной, так и в боковых цепочках аминокислот молекулы цитокина. Эти изменения предполагают наличие конформационных изменений в ИФН- γ под действием ВР-АТ-ИФН- γ . Результаты 2D-протонного ЯМР-спектроскопического анализа (^1H - ^{15}N HSQC) ИФН- γ в присутствии ВР-АТ-ИФН- γ свидетельствуют об изменениях в химических сдвигах соответствующих аминокислот, расположенных преимущественно в интерфейсе димера и в С-концевой области ИФН- γ (в общей сложности 13 четко смещенных пиков). Подобные изменения не наблюдались при добавлении плацебо.

Полученные данные убедительно свидетельствуют о том, что под воздействием ВР-АТ-ИФН- γ происходит изменение структуры ИФН- γ , сфокусированное на границе интерфейса между двумя мономерами и в С-концевой области цитокина, которое может оказывать значительное влияние на функцию белка. Об этом свидетельствует опосредованное ВР-АТ-ИФН- γ увеличение специфического связывания ИФН- γ с его рецепторами на клетках U-937, усиление индуцированной секреции ИФН- γ в культуре мононуклеарных клеток периферической крови человека и увеличение выживаемости инфицированных гриппом А мышей.

Экспериментальное исследование связывания ИФН- γ с его рецепторами проводилось компанией Euroscreen S.A. (Бельгия) на моноцитах человека с использованием клеточной линии U-937, которая характеризуется высоким уровнем экспрессии высокоаффинных рецепторов к ИФН- γ . Добавление в культуру клеток ВР-АТ-ИФН- γ привело к значительному увеличению специфического связывания меченного ИФН- γ (^{125}I ИФН- γ) с рецепторами ИФН- γ на 148.92%. В группах сравнения % специфического связывания составил 119.50% для контроля (растворитель) и 109.11% для неспецифического контроля (высокие разведения антител к фактору некроза опухоли альфа).

Продукция ИФН- γ мононуклеарными клетками периферической крови *in vitro* изучалась компанией U-Cytech Bioscience (Нидерланды). С помощью метода ELISpot, позволяющему количественно оценить секрецию ИФН- γ , показано, что добавление ВР-АТ-ИФН- γ в культуру клеток повышает число продуцирующих ИФН- γ клеток в среде (40 пятен [IQR=13] против 26 пятен [IQR=4] в контроле, $p < 0,05$). Интактные клетки в фоновых лунках не показали никакой активности. Полученные данные указывают на то, что ВР-АТ-ИФН- γ участвуют в регуляции уровней ИФН- γ , усиливая секрецию ИФН- γ и/или индуцируя пролиферацию ИФН- γ -продуцирующих клеток.

Противовирусная активность ВР-АТ-ИФН- γ в отношении вируса гриппа (А/Equi2/Miami/1/63 [H3N8] и А/California/07/2009 [H1N1] pandemic) изучалась компанией ARcis (Франция). Зараженным животным (мыши) вводили перорально ВР-АТ-ИФН- γ (за 5 дней до заражения и в течение 21 (H1N1) или 26 (H3N8) дней после), растворитель (питьевая вода), классический противовирусный препарат осельтамивир (Тамифлю) или комбинацию ВР-АТ-ИФН- γ и осельтамивира (для H1N1). Показано, что ВР-АТ-ИФН- γ были более эффективны в снижении смертности, чем осельтамивир: выживаемость составила 95% против 75% для [H3N8] ($p > 0,05$) и 80% против 70% для [H1N1] ($p > 0,05$). Выживаемость животных в группах ВР-АТ-ИФН- γ и осельтамивир была статистически значимо выше, чем в группах контроля ($p < 0,05$), в которых она составила 20% для [H3N8] и 30% для [H1N1]. И наконец, выживаемость при комбинированном лечении ВР-АТ-ИФН- γ и осельтамивиром составила 75% против 70% для осельтамивира в режиме монотерапии при [H1N1] ($p > 0,05$).

Таким образом, в отличие от традиционных препаратов на основе антител, высокие разведения антител действуют, вызывая конформационные изменения в своих мишенях, которые затем влияют на взаимодействие модифицированных мишеней с соответствующими рецепторами и, в конечном итоге, регулируют связанный с мишенью биологический путь. Высокие разведения биологических препаратов – революционный подход к разработке и клиническому применению препаратов на основе антител.