

СОРБЦИЯ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ 12 И 23 С ПОМОЩЬЮ РАЗРАБОТАННОГО МАГНИТОУПРАВЛЯЕМОГО СОРБЕНТА НА ОСНОВЕ УСТЕКИНУМАБА

DOI: 10.17691/stm2020.12.4.09

УДК 616.517-092-097:544.72

Поступила 26.06.2019 г.

**И.П. Гонтарь**, д.м.н., профессор, зав. лабораторией клинической иммунологии;**О.И. Емельянова**, к.м.н., ведущий научный сотрудник;**О.А. Русанова**, к.м.н., младший научный сотрудник;**И.А. Зборовская**, д.м.н., профессор, директорНаучно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии
им. А.Б. Зборовского, ул. Землячки, 76, Волгоград, 400138

Цель исследования — оценка сорбционной возможности препарата на основе интерлейкинов 12 (IL-12) и 23 (IL-23) Устекинумаба при использовании его с магнитоуправляемым сорбентом.

Материалы и методы. Для снижения концентрации провоспалительных цитокинов (IL-12, IL-23) осуществлено пропускание крови больных псориатическим артритом через магнитоуправляемые полиакриламидные гранулы (МПГ) сферической формы с размером частиц 10–100 мкм, предварительно полученные методом эмульсионной полимеризации. Перфузию выполняли через колонку объемом 10 мл, оборудованную электромагнитом, в которую вносили МПГ с иммобилизованными антителами к IL-12 и IL-23. Источником антител к этим интерлейкинам явился коммерческий препарат Устекинумаб с концентрацией моноклональных антител 0,2 мг в 1 мл физиологического раствора. Удельную сорбционную емкость МПГ определяли с помощью колонки, заполненной гранулами в объеме 0,2 мл, при последующем взаимодействии с 1 мл раствора IL-12 и IL-23 с возрастающими концентрациями. Обработке *in vitro* подвергалась гепаринизированная кровь 10 больных псориатическим артритом различной степени активности, которым в течение 12 мес не проводили парентерального введения ингибиторов цитокинов IL-12 и IL-23 (Устекинумаба). В качестве контроля выступала кровь 10 здоровых доноров, процедура перфузии была аналогичной.

Результаты. Цифровые показатели для каждой пробы измеряли до и после взаимодействия сорбента и плазмы крови. Отмечено значительное уменьшение цитокинов от исходного — на 99,8% (у доноров) и на 99,9% (у больных). При использовании углеродного сорбента их концентрация уменьшается на 92,6% от исходного. В результате сорбции концентрация форменных элементов крови достоверно не менялась, что является дополнительным положительным моментом этой процедуры.

Заключение. Максимально возможное снижение уровня цитокинов имеет большое практическое значение, так как они играют ведущую роль в патогенезе псориатического артрита. Применение синтезированного сорбента на основе Устекинумаба — высокоэффективный способ одновременного удаления их из плазмы крови.

Ключевые слова: интерлейкин-12; IL-12; интерлейкин-23; IL-23; псориатический артрит; антитела; магнитосорбенты; сорбция.

Как цитировать: Gontar I.P., Emelyanova O.I., Rusanova O.A., Zborovskaya I.A. Sorption of interleukins 12 and 23 using the developed magnetocontrollable ustekinumab-based sorbent. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2020; 12(4): 72–76, <https://doi.org/10.17691/stm2020.12.4.09>

English

Sorption of Interleukins 12 and 23 Using the Developed Magnetocontrollable Ustekinumab-Based Sorbent

I.P. Gontar, MD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Clinical Immunology;**O.I. Emelyanova**, MD, PhD, Leading Researcher;**O.A. Rusanova**, MD, PhD, Junior Researcher;**I.A. Zborovskaya**, MD, DSc, Professor, DirectorResearch Institute of Clinical and Experimental Rheumatology named after A.B. Zborovsky, 76 Zemlyachki St.,
Volgograd, 400138, Russia

Для контактов: Емельянова Ольга Ивановна, e-mail: emelyanova.vlg@mail.ru

The aim of the study was to assess the sorption capacity of Ustekinumab, a drug based on interleukins 12 (IL-12) and 23 (IL-23), when using it with a magnetocontrollable sorbent.

Materials and Methods. To reduce the concentration of proinflammatory cytokines (IL-12, IL-23), the blood of patients with psoriatic arthritis was passed through magnetocontrollable polyacrylamide granules (MPG) of spherical shape with the particle size of 10–100 μm , obtained by emulsion polymerization. Perfusion was performed through a 10 ml column equipped with an electromagnet, into which MPG with immobilized antibodies to IL-12 and IL-23 was added. Ustekinumab, a commercial drug with concentration of monoclonal antibodies equaling 0.2 mg per 1 ml of saline was used as the source of antibodies to these interleukins. The specific sorption capacity of MPG was determined using a column filled with the granules in a volume of 0.2 ml and inducing their subsequent interaction with 1 ml of IL-12 and IL-23 solutions with increasing concentrations. The heparinized blood of 10 patients with psoriatic arthritis of various degrees of activity, who had no parenteral administration of IL-12/IL-23 inhibitors (Ustekinumab) for 12 months, was subjected to *in vitro* treatment. The blood of 10 healthy donors was used as the control; the perfusion procedure was similar.

Results. Digital parameters were measured for each sample before and after the interaction between the sorbent and blood plasma. There was a significant decrease in cytokines from the baseline — by 99.8% (in donors) and by 99.9% (in patients). When using a carbon sorbent, their concentration decreases by 92.6% from the baseline. As a result of sorption, blood cell counts did not change reliably, which is an additional positive aspect of this procedure.

Conclusion. The maximum possible decrease in the level of cytokines has great practical importance, since they play a leading role in the pathogenesis of psoriatic arthritis. The use of a synthesized Ustekinumab-based sorbent is a highly effective way of removing them simultaneously from blood plasma.

Key words: interleukin-12; IL-12; interleukin-23; IL-23; psoriatic arthritis; antibodies; magnetosorbents; sorption.

Введение

Известно, что в патогенезе многих ревматических аутоиммунных заболеваний, включая и псориатический артрит, ведущую роль играют белковые регуляторы, которые являются медиаторами роста и участвуют в дифференцировке лимфоидных и мезенхимальных клеток и клеток иммунного воспаления. Именно клетки иммунной системы, такие как фибробласты, тромбоциты, моноциты, макрофаги, синтезируют цитокины, интерлейкины, интерфероны и другие факторы иммунного воспаления [1–3].

При псориатическом артрите и других иммунных заболеваниях наблюдается патологический синтез интерлейкинов 12 и 23 (IL-12 и IL-23). Повышенное содержание IL-12 синхронизировано с количеством IL-1, IL-2, IL-10, интерфероном- α (IFN- α) и фактором некроза опухоли- α (TNF- α). Их повышенный уровень обнаружен в синовиальной ткани.

Указанные интерлейкины являются гетеродимерными цитокинами, содержат две субъединицы гликозилированных протеинов, соединенные дисульфидными связями и имеющие общую субъединицу p40. При взаимодействии ее с субъединицей p35 образуется IL-12, а с субъединицей p19 — IL-23. Эти цитокины синтезируются преимущественно макрофагами, дендритными клетками. Они реализуют свое биологическое действие, фиксируясь на двухцепочечных гетеродимерных рецепторных комплексах, которые находятся на поверхности CD4⁺ Т-лимфоцитов и естественных киллеров (NK-клеток). IL-23 стимулирует Th17-лимфоциты, которые начинают продуцировать провоспалительные факторы, включая IL-17, а те по принципу обратной связи вызывают синтез других провоспалительных агентов [4–7].

В последние годы с помощью методов биотехнологии созданы принципиально новые противовоспалительные средства — генно-инженерные биологические препараты, применение которых позволило существенно повысить эффективность фармакотерапии ревматических заболеваний. К ним относятся моноклональные антитела к определенным детерминантам иммунокомпетентных клеток, или провоспалительным цитокинам, и гибридные белковые молекулы, ингибирующие активность цитокинов или взаимодействие Т- и В-лимфоцитов. Основным преимуществом этих препаратов является их высокая специфичность, которая обеспечивает селективное воздействие на определенные звенья патогенеза иммуновоспалительных заболеваний, в минимальной степени затрагивая нормальные механизмы функционирования иммунной системы [8].

В настоящее время для лечения псориатического артрита широко используется парентеральное введение ингибитора IL-12 и IL-23 — генно-инженерного биологического препарата Устекинумаба (Cilag AG, Швейцария) на основе моноклональных антител к IL-12 и IL-23 [8, 9]. Этот коммерческий препарат — ингибитор интерлейкина, представляющий собой человеческие моноклональные антитела класса IgG1k, продуцируемые рекомбинантной клеточной линией и проходящие многоступенчатую очистку, включая инактивацию и удаление вирусных частиц. Высокое биологическое сродство и специфичность препарата к субъединице p40 интерлейкинов человека IL-12 и IL-23 обеспечивает блокирующий эффект, предотвращая их активное взаимодействие с рецептором IL-12R β 1 и с субъединицей p40, одновременно нейтрализуя обе молекулы. Данный препарат быстро снижает активность заболевания, замедляет деструкцию

пораженных суставов. Однако побочные эффекты — частые аллергические и инфузионные реакции — и высокая стоимость ограничивают его применение для одного и того же больного. Удобным патогенетическим инструментом подавления активности изучаемых интерлейкинов при аутоиммунных заболеваниях служит элиминация их из кровотока с помощью магнитоуправляемых сорбентов. Известен метод удаления цитокинов с помощью углеродного сорбента с поверхностью, локально модифицированной аминокaproновой кислотой [10]. В этом случае сорбция цитокинов из сыворотки крови осуществляется через твердофазный носитель — модифицированную поверхность углеродного адсорбента аминокaproновой кислотой с последующей ее поликонденсацией. Авторами для снижения концентрации провоспалительных цитокинов IL-12 и IL-23 предложено пропускание крови больных псориатическим артритом через предварительно полученные методом эмульсионной полимеризации гранулы [11]. Источником антител к интерлейкинам явился коммерческий препарат Устекинумаб [12].

Цель исследования — оценка сорбционной возможности препарата на основе интерлейкинов 12 и 23 Устекинумаба при использовании его с магнитоуправляемым сорбентом.

Материалы и методы

Обработке *in vitro* подвергалась гепаринизированная кровь 10 больных псориатическим артритом различной степени активности, которым в течение 12 мес не проводилось парентерального введения ингибиторов цитокинов. Для контроля использовали кровь 10 здоровых доноров, процедура перфузии была аналогичной.

В качестве источника антител к IL-12 и IL-23, которые были иммобилизованы на гранулы сферической формы с размером частиц 10–100 мкм, использован Устекинумаб с концентрацией моноклональных антител 0,2 мг в 1 мл физиологического раствора. После завершения полимеризации гранулы отмывали.

Определение удельной сорбционной емкости магнитоуправляемых полиакриламидных гранул (МПГ)

проводилось следующим образом. Через мини-колонку с объемом рабочей камеры 0,2 мл, заполненную МПГ, пропускали 1 мл смеси растворов IL-12 и IL-23 с возрастающими концентрациями. После перфузии каждого варианта раствора МПГ заменяли, контур промывали 1 М глицин-HCl буфером, pH=2,2 и стандартным фосфатно-солевым буферным раствором. Концентрацию IL-12 и IL-23 в десорбированных растворах определяли методом ИФА с использованием коммерческих наборов (Bender MedSystems, США — для IL-12, Bender MedSystems, Австрия — для IL-23). При изучении получающихся растворов IL-12 и IL-23 с исходными концентрациями 5, 10, 50, 100, 500, 1500 пг/мл после их перфузии через МПГ интерлейкины практически не определялись.

Статистическая обработка данных проводилась с применением пакетов программ Statistica 6.0, Excel 5.0, Statgraphics 3.0, SPSS 12.0. Выборочные характеристики выражались как среднее значение (M) и стандартное отклонение (σ). Для оценки количественных различий в разных группах применяли t -критерий Стьюдента. Полученные результаты оценивались с помощью величины p (p -value) — вероятность того, что получаемый в исследовании эффект носит случайный характер. Значение $p < 0,05$ было принято условием статистической значимости различий значений.

Результаты и обсуждение

Динамика плазменной концентрации интерлейкинов у доноров и больных псориатическим артритом приведена в табл. 1. Показано, что при перфузии через магнитоуправляемый сорбент достигается статистически значимое снижение содержания IL-12 и IL-23 от исходного как у больных, так и у здоровых лиц. При этом максимально возможное снижение уровня цитокинов имеет большое практическое значение, так как они играют ведущую роль в патогенезе псориатического артрита. При использовании описанного в литературе [10] углеродного сорбента их концентрация уменьшается на 92,6% от исходного.

Перфузия крови через сорбент осуществлялась в

Т а б л и ц а 1

Изменение концентраций IL-12 и IL-23 в результате перфузии через магнитоуправляемые полиакриламидные гранулы с иммобилизованными к ним антителами, % ($M \pm \sigma$)

Группа	IL-12		IL-23	
	Исходно	После перфузии	Исходно	После перфузии
Здоровые доноры (n=10)	63,23±14,17 (—)	0,04±0,02 (99,8)	50,12±12,16 (—)	0,03±0,01 (99,9)
Больные псориатическим артритом (n=10)	85,16±39,28 (—)	0,02±0,01 (99,9)	70,53±28,14 (—)	0,04±0,01 (99,9)

Примечание: статистическая значимость различий значений показана до и после перфузии, $p < 0,001$ во всех случаях (в скобках указан прирост концентрации в процентах).

Таблица 2

Изменение концентрации форменных элементов крови в результате перфузии через магнитоуправляемые полиакриламидные гранулы с иммобилизованными антителами к IL-12 и IL-23 (M±σ)

Показатель	Исходно (n=10)	После перфузии (n=10)
Эритроциты, ×10 ¹² /л	3,80±0,07	3,70±0,06
Лейкоциты, ×10 ⁹ /л	5,90±0,21	5,60±0,21
Тромбоциты, ×10 ⁹ /л	250,0±8,89	245,0±8,41

Примечание: статистическая значимость различий значений показана при сравнении с исходными данными, p≤0,05.

аппарате, содержащем колонку объемом 10 мл, оборудованную электромагнитом, в которую вносили МПГ с иммобилизованными антителами к IL-12 и IL-23. Через колонку перфузировали 20 мл нативной гепаринизированной крови со скоростью 10 мл/ч. После окончания перфузии МПГ отмывали от несвязавшихся белков забуференным физиологическим раствором (рН=7,4) и проводили регенерацию 1 М глицин-HCl буфером рН=2,2 по 10 мин. После первой регенерации потеря сорбционной емкости составила 15%. При последующих повторных регенерациях (9 раз) статистически значимых изменений удельной сорбционной емкости не происходило.

Концентрацию цитокинов IL-12 и IL-23 плазмы крови определяли методом ИФА с использованием коммерческих наборов Bender MedSystems, так же оценивали содержание форменных элементов крови (эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов). Значения всех исследуемых показателей для каждого образца измеряли двукратно — до и после перфузии.

При удалении цитокинов содержание форменных элементов крови статистически значимо не меняется, что является дополнительным преимуществом предложенного способа перфузии (табл. 2).

Заключение

Результаты сорбции IL-12 и IL-23 с использованием синтезированного нами магнитоуправляемого сорбента на основе полиакриламидного геля и Устекинумаба говорят о высоком и эффективном удалении патогенетических цитокинов. Этот сорбент обладает малой травматичностью по отношению к форменным элементам крови и низкой неспецифической сорбцией. Экстракорпоральное удаление цитокинов из кровотока может быть перспективным подготовительным этапом при лечении генно-модифицированными препаратами больных с ревматическими заболеваниями. Подобные действия при использовании антителых коммерческих препаратов на основе специфических

моноклональных иммуноглобулинов и при возможном «цитокиновом шторме» в патогенезе аутоиммунных болезней можно применять в терапии и других ревматических заболеваний.

Финансирование исследования. Работа не имела спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Бадюкин В.В. К вопросу о классификации псориатического артрита. *Клиническая ревматология* 1995; 1: 53–56.

Badokin V.V. On the classification of psoriatic arthritis. *Klinicheskaya revmatologiya* 1995; 1: 53–56.

2. Зборовская И.А., Бедина С.А., Мозговая Е.Э., Слюсарь О.П. Энзимный профиль плазмы крови у больных анкилозирующим спондилитом и псориатическим артритом. В кн.: *Актуальные проблемы современной ревматологии*. Выпуск XXXIV. М: Планета; 2018; с. 69–74.

Zborovskaya I.A., Bedina S.A., Mozgovaya E.E., Slusar O.P. Enzimnyy profil' plazmy krovi u bol'nykh ankiroziruyushchym spondilitom i psoriaticheskim artritom. V kn.: *Aktual'nyye problemy sovremennoy revmatologii*. Vypusk XXXIV [Enzymatic profile of blood plasma in patients with ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis. In: Actual problems of modern rheumatology. Issue XXXIV]. Moscow: Planeta; 2018; p. 69–74.

3. Молочков В.А., Бадюкин В.В., Альбанова В.И., Волнухин В.А. *Псориаз и псориатический артрит*. М: 2007.

Molochkov V.A., Badokin V.V., Albanova V.I., Volnukhin V.A. *Psoriasis i psoriaticheskiy artrit* [Psoriasis and psoriatic arthritis]. Moscow; 2007.

4. Toti D.C., Feldman S.R. Interleukin-12, interleukin-23, and psoriasis: current prospects. *J Am Acad Dermatol* 2007; 57(6): 1059–1068, <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2007.07.016>.

5. Dougados M., van der Linden S., Juhlin R., Huitfeldt B., Amor B., Calin A., Cats A., Dijkmans B., Olivieri I., Pasero G., Veys E., Zeidler H. The European Spondyloarthritis Study Group preliminary criteria for the classification of spondyloarthritis. *Arthritis Rheum* 1991; 34(10): 1218–1227, <https://doi.org/10.1002/art.1780341003>.

6. Shibata S., Tada Y., Komine M., Hattori N., Osame S., Kanda N., Watanabe S., Saeki H., Tamaki K. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and IL-23p19 in psoriatic arthritis. *J Dermatol Sci* 2009; 53(1): 34–39, <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2008.06.008>.

7. Корсакова Ю.Л., Станислав М.Л., Денисов Л.Н., Насонов Е.Л. Устекинумаб — новый препарат для лечения псориаза. *Научно-практическая ревматология* 2013; 51(2): 170–180.

Korsakova Yu.L., Stanislav M.L., Denisov L.N., Nasonov E.L. Ustekinumab is a new drug to treat psoriasis and psoriatic arthritis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya* 2013; 51(2): 170–180.

8. Насонов Е.Л. *Генно-инженерные биологические препараты в лечении ревматоидного артрита*. М: ИМА-ПРЕСС; 2013; 552 с.

Nasonov E.L. *Genno-inzhenernyye biologicheskie preparaty v lechenii revmatoidnogo artrita* [Genetically engineered

biological drugs in the treatment of rheumatoid arthritis]. Moscow: IMA-PRESS; 2013; 552 p.

9. Симонова О.В., Смирнова Л.А., Тимин М.В. Оценка безопасности применения генно-инженерной биологической терапии у больных псориазическим артритом. В кн.: *Актуальные проблемы современной ревматологии*. Выпуск XXXIV. М: Планета; 2018; с. 108–110.

Simonova O.V., Smirnova L.A., Timin M.V. Otsenka bezopasnosti primeneniya genno-inzhenernoy biologicheskoy terapii u bol'nykh psoriaticheskim artritom. V kn.: *Aktual'nye problemy sovremennoy revmatologii*. Vypusk XXXIV [Assessment of the safety of genetic engineering biological therapy in patients with psoriatic arthritis. In: Actual problems of modern rheumatology. Issue XXXIV]. Moscow: Planeta; 2018; p. 108–110.

10. Долгих Т.И., Пьянова Л.Г., Бакланова О.И., Долгих В.Т., Лузянина Л.С., Филиппов С.И., Соколова Т.Ф., Саланов А.Н., Глущенко А.В., Ершов А.В., Рейс Б.А., Лихолобов В.А. Адсорбция цитокинов на поверхности модифицированного углеродного сорбента in vitro при перитоните. *Общая реаниматология* 2009; 6: 66–69, <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2009-6-66>.

Dolgikh T.I., Pyanova L.G., Baklanova O.N., Dolgikh V.T., Luzyanova L.S., Filippov S.I., Sokolova T.F., Salanov A.N., Glushchenko A.V., Yershov A.V., Reis B.A., Likhobov V.A. Cytokine adsorption onto the modified carbon sorbent surface in vitro in peritonitis. *Obshchaya reanimatologiya* 2009; 6: 66–69, <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2009-6-66>.

11. Гонтарь И.П., Зборовский А.Б., Левкин С.В., Сычева Г.Ф. *Способ получения магнитных полиакриламидных гранул*. Патент РФ 1582657. 1993.

Gontar I.P., Zborovskiy A.B., Levkin S.V., Sycheva G.F. *Method of magnetic polyacrylamide granule producing*. Patent RU 1582657. 1993.

12. Гонтарь И.П., Емельянова О.И., Русанова О.А., Маслакова Л.А., Зборовская И.А. *Способ одновременного удаления интерлейкина-12 и интерлейкина-23 из биологических жидкостей с помощью магнитоуправляемых гранул*. Патент РФ 2670674. 2018.

Gontar I.P., Emelyanova O.I., Rusanova O.A., Maslakova L.A., Zborovskaya I.A. *Method of simultaneous removal of interleukin-12 and interleukin-23 from biological fluids using magnetically controlled granules*. Patent RU 2670674. 2018.