

На правах рукописи

Дмитриев Дмитрий Александрович

**Анализ связывания биспецифических моноклональных антител с
иммобилизованными антигенами**

03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2006

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии Химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, в ЗАО «НПП Иммунотех» и в Государственном учреждении Научно-исследовательском институте биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича Российской академии медицинских наук.

НАУЧНЫЕ РУКОВОДИТЕЛИ:

кандидат химических наук

доцент

Осипов Александр Павлович

доктор биологических наук

Иванов Юрий Дмитриевич

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор биологических наук,

профессор,

Максименко Александр Васильевич

доктор биологических наук,

профессор,

Говорун Вадим Маркович

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Институт биохимии им. А.Н. Баха

Российской академии наук

Защита состоится «19» октября 2006 г. в 12.30 часов на заседании Диссертационного совета Д 001.010.01 при Государственном учреждении Научно-исследовательском институте биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича Российской академии медицинских наук по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, корп. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Государственного учреждения Научно-исследовательского института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича Российской академии медицинских наук по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, корп. 1.

Автореферат разослан «___» _____ 2006 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

В.С. Былинкина

ВВЕДЕНИЕ

Гибридная технология, наряду с обычными моноклональными антителами (МКА), позволяет получать биспецифические моноклональные антитела (БИАТ), конструируемые методами клеточной инженерии. Достоинство этого метода заключается в возможности получать совершенно однородные молекулы БИАТ, сохраняющие структуру «полумолекул» родительских антител (рис. 1). Основное различие БИАТ (класса IgG) и обычных моноклональных антител состоит в следующем. Молекула МКА имеет два антигенсвязывающих сайта. БИАТ также имеют два сайта связывания, но их специфичность различна: первый из сайтов специфичен к одному антигену, второй - к другому (рис. 1).

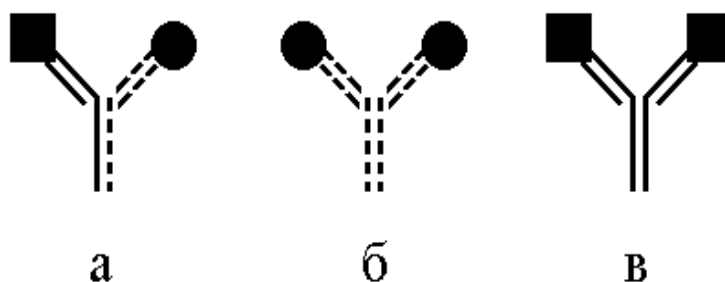


Рисунок 1. Связывание антител с антигенами. а) Биспецифические моноклональные антитела связываются с двумя разными антигенами; б) и в) родительские моноклональные антитела связываются с двумя одинаковыми антигенами.

Актуальность проблемы. БИАТ могут служить «мостиком» между антигеном и маркерной молекулой (например, ферментом). Именно поэтому многие исследователи считают их конъюгатами нового поколения, поскольку теперь нет необходимости метить МКА. Большой массив публикаций свидетельствует о высокой эффективности БИАТ в твердофазных системах. Вместе с тем, отсутствуют работы, в которых теоретически и экспериментально сравнивались бы свойства БИАТ и обычных МКА при связывании с иммобилизованным антигеном. Исследование вопроса о связывании БИАТ с иммобилизованным антигеном не только имеет большое значение для использования этого класса биомолекул, но и представляет определенный интерес с точки зрения изучения взаимодействия МКА с иммобилизованными антигенами.

С иммобилизованным антигеном МКА (класса IgG) могут связываться как одним антигенсвязывающим сайтом, моновалентно, так и двумя антигенсвязывающими сайтами одновременно, бивалентно, а БИАТ (класса IgG) представляют собой моновалентные молекулы в отношении каждого из антигенов. При использовании МКА в иммуногистохимии, иммуноблоттинге, иммуноферментном анализе (ИФА) и других твердофазных системах необходима количественная оценка процесса связывания антител с иммобилизованным антигеном. Для характеристики связывания МКА особенное значение имеют две величины: аффинность, характеризующая степень сродства антитела к данному эпитопу антигена, и авидность, или общая мера стабильности комплекса антиген-антитело. Различие между аффинностью и авидностью может быть обусловлено способностью антител (например, класса IgG) бивалентно взаимодействовать с иммобилизованным антигеном. За счет бивалентного связывания происходит значительное возрастание эффективности связывания антител с антигеном на твердой фазе. Из-за стерических факторов не все антитела способны связываться с иммобилизованным антигеном бивалентно. Наличие бивалентного связывания антител с иммобилизованным антигеном необходимо доказывать не только для каждой пары

антитело—антиген, но и для каждого клона антител к данному антигену. Ранее бивалентное связывание антител с иммобилизованным антигеном доказывали и изучали путем сравнения нативных антител и их Fab фрагментов - относительно небольших фрагментов антител, которые включают антигенсвязывающий сайт и образуются в результате обработки антител папаином. Fab фрагменты могут связываться с иммобилизованным антигеном только моновалентно и, таким образом, служат в качестве инструмента для количественной оценки аффинности. Сравнительный анализ связывания с иммобилизованным антигеном нативных антител и их Fab фрагментов является классической иммунологической моделью для апробации новых методов исследования. Следует отметить, что упомянутое сравнение не является достаточно полноценным. Несовершенство подобного сравнения заключается в том, что структура Fab фрагментов отлична от структуры нативных молекул антител. Имеются данные, что Fc участок может иметь значение для антигенсвязывающей способности антител (например, он может влиять на гибкость молекулы).

С другой стороны, бивалентное связывание антител с иммобилизованным антигеном можно изучать путем сравнения констант связывания антител в растворе и на твердой фазе. При этом константа связывания антител в растворе служит в качестве инструмента для количественной оценки аффинности. Однако, иммобилизация антигена на твердой фазе (например, на поверхности иммунного планшета) часто приводит к частичному изменению конформационной структуры белка, изменяющей его антигенсвязывающие свойства. Таким образом, аффинность антител, измеряемая в растворе, не является истинной для экспериментов, в которых антитела связываются с иммобилизованным антигеном. На наш взгляд, идеальной моделью для оценки аффинности моновалентного связывания могут служить БИАТ. Структура «полумолекул» БИАТ тождественна структуре «полумолекул» нативных родительских антител (рис. 1). И за исключением одного из переменных участков и первичная, и третичная структура БИАТ совпадает со структурой нативных родительских антител (в том случае, когда обе «полумолекулы» БИАТ относятся к одному подклассу IgG).

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось количественное изучение взаимодействия родительских моноклональных и биспецифических моноклональных антител с иммобилизованными антигенами. Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

1) Получить аффинно-очищенные моноклональные и образованные от них биспецифические моноклональные антитела. В качестве антигенов были выбраны следующие протеины: пероксидаза хрена (HRP), миоглобин человека (Mb) и иммуноглобулин G человека (hIgG).

2) Теоретически рассмотреть равновесные и кинетические закономерности взаимодействия обычных моноклональных антител и образованных от них биспецифических моноклональных антител с иммобилизованными антигенами.

3) Экспериментально изучить характер и определить количественные характеристики иммунологического взаимодействия на примере трех клонов обычных антител: антимиоглобиновых (анти-Mb), антипероксидазных (анти-HRP) и антител против IgG человека (анти-hIgG); и двух клонов образованных от них биспецифических антител (биспецифические антитела, несущие сайты связывания с миоглобином и пероксидазой хрена (анти-Mb/HRP), и биспецифические антитела, несущие сайты связывания с IgG человека и пероксидазой хрена (анти-hIgG/HRP)). Провести сравнение с использованием иммуноферментного, радиоиммунологического методов и с помощью

оптического биосенсора, основанного на принципе «резонансное зеркало» (IASys). Соотнести результаты, полученные тремя методами.

4) Апробировать иммунологическую модель, предполагающую сравнительный анализ связывания родительских моноклональных антител и биспецифических моноклональных антител, для определения типа взаимодействия антител с иммобилизованным антигеном (моновалентного или бивалентного). В качестве инструмента для оценки аффинности моновалентного связывания использовать биспецифические моноклональные антитела.

5) Изучить возможность бивалентного связывания биспецифических моноклональных антител с различными антигенами одновременно иммобилизованными на твердой фазе.

Научная новизна и научно-практическая значимость исследования. В результате проведенного исследования впервые теоретически и экспериментально были сравнены свойства БИАТ и обычных МКА при связывании с иммобилизованным антигеном. Изучение этого вопроса имеет большое значение для использования БИАТ во всех твердофазных системах. Экспериментально эффективность связывания БИАТ с иммобилизованными антигенами в сравнении с родительскими антителами изучалась ранее только одной группой исследователей, к сожалению, их результаты не интерпретируются существующей теорией.

Впервые предложена и апробирована иммунологическая модель, предполагающая сравнительный анализ связывания родительских МКА и БИАТ, для определения типа взаимодействия антител с иммобилизованным антигеном (моновалентного или бивалентного).

Также впервые с помощью иммуноферментного метода показано существование бивалентного связывания БИАТ с двумя антигенами, одновременно адсорбированными на твердой фазе.

Важный методический аспект имеет сравнительный анализ связывания родительских МКА и БИАТ с иммобилизованным антигеном с помощью современного оптического биосенсора IAsys, основанного на принципе «резонансное зеркало». Это метод нового поколения, который в близком будущем придет на смену традиционному ИФА, который используется для количественной оценки иммунологических взаимодействий в настоящее время.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на международной конференции: «Биокатализ-2002» (Москва-2002).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ.

Структура диссертации. Диссертация изложена на ____ страницах и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, экспериментальная часть, результаты и обсуждение, выводы и список литературы (122 источника). Работа содержит 5 таблиц и 25 иллюстраций.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Получение аффинно-очищенных моноклональных и образованных от них биспецифических моноклональных антител

1.1. Клеточные линии

В качестве источников моноспецифических и биспецифических антител использовали панель гибридом и тетрадом, полученных в лаборатории нейроиммунологии ИВНД и НФ РАН под руководством Ю.С. Массино. Специфичность продуцируемых антител и их изоотипы приведены в таблице 1.

Изначально, при получении МКА в качестве антигена был выбран миоглобин, поскольку тест-системы (например, сэндвич-метод) определения миоглобина могут играть важную роль в ранней диагностике инфаркта. Иммуноглобулин G человека был выбран, поскольку множество исследовательских и клинических тест-систем (например, тестирование СПИДА) определяют наличие в крови человека антител к какому-либо антигену. При получении БИАТ в качестве второго антигена была выбрана пероксидаза, так как БИАТ могут служить «мостиком» между антигеном и ферментом (например, пероксидазой). Именно поэтому многие исследователи считают их конъюгатами нового поколения, поскольку теперь нет необходимости метить МКА.

Таблица 1. Характеристика антител использованных в работе

Клеточная линия	Изотип антител	Специфичность антител
Гибридомы родители		
36F9	IgG1	Антипероксидаза (HRP)
75G5	IgG1	Анти-IgG человека (hIgG)
14D6	IgG1	Антимиоглобин (Мб)
Тетрадомы		
75G5×36F9	IgG1/IgG1	Анти-hIgG/HRP
14D6×36F9	IgG1/IgG1	Анти-Мб/HRP

1.2. Приготовление аффинных носителей

Антигены (Мб, HRP и hIgG) ковалентно связывали с BrCN-сефарозой в соответствии с рекомендациями фирмы "Farmacia". 1 мг антигена конъюгировали со 100 мг BrCN-сефарозы. Перед конъюгацией необходимое количество BrCN-сефарозы 4В предварительно промывали 15 мин раствором HCl (pH=2.0) для удаления стабилизирующих добавок декстрана и лактозы. Активированную сефарозу промывали большим избытком дистиллированной воды, суспендировали в 5 объемах (по отношению к весу сухой сефарозы) 0,1 М NaHCO₃ с 0,5 М NaCl и добавляли конъюгируемый белок, растворенный в минимальном объеме того же буфера. Реакцию проводили при мягком перемешивании на круговом смесителе (30 об/мин) в течение ночи при 4°C. Содержимое пробирки центрифугировали (5 минут, 1000g, 5°C) и определяли в надосадочной жидкости количество несвязавшегося лиганда по оптической плотности при 280 нм. Активные группы инактивировали добавлением глицина (3 - 5 мг/мл) с последующим перемешиванием на круговом смесителе при комнатной температуре в течение двух часов. Для удаления нековалентно адсорбированного белка проводили холостую хроматографию с полученным сорбентом: вначале пропускали PBS, затем 0,1 М уксусную кислоту (до pH 2,2 доводили HCl) и затем PBS. Эффективность конъюгирования белка с сефарозой указанным методом достигала 96%.

1.3. Аффинная очистка моноспецифических антител

Моноспецифические антитела (анти-HRP, анти-Мб и анти-hIgG) очищали из асцитных жидкостей (полученных в лаборатории нейроиммунологии ИВНД и НФ РАН под руководством Ю.С. Массино) соответствующих гибридом с помощью одностадийной аффинной хроматографии. Предварительно IgG асцитных жидкостей осаждали сульфатом аммония (0,5 г/мл, 12 ч, 5°C). Осадок, полученный после центрифугирования (4000 об/мин., 5°C, 20 мин.), растворяли в 15 - 30 мл PBS и пропускали через колонку с

иммуносорбентом (размер колонки: диаметр 5 мм, высота 15 мм) со скоростью 15 мл/час. Иммуносорбент промывали тем же буфером до исчезновения поглощения при 280 нм. Антитела элюировали 0,1 М уксусной кислотой рН 2,2 (доводили HCl). Элюат нейтрализовали концентрированным аммиаком. Показано, что аффинноочищенные антитела сохраняют свою иммунологическую активность, так как при повторной аффинной хроматографии более 99% антител вновь связывалось с аффинным носителем.

1.4. Аффинная очистка биспецифических антител

Аффинную очистку биспецифических антител из асцитных жидкостей проводили в две стадии: путем последовательных аффинных хроматографий. Все БИАТ нашей панели несли сайт связывания с пероксидазой. Первый этап очистки БИАТ - аффинная хроматография на HRP-сефарозе. Второй этап очистки - хроматография на соответствующем антиген-сефарозном носителе (так, для антител со специфичностью анти-hIgG/HRP второй этап - хроматография на hIgG-сефарозе). Все процедуры аффинной хроматографии совпадают с процедурами, описанными в разделе 1.3. В результате фракционирования для каждого БИАТ было получено три субфракции активных антител. Сводные данные о количественном составе активных продуктов секреции тетрадом приведены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты аффинной очистки продуктов секреции гибридных гибридом из асцитной жидкости

Тетрадома	Специфичность биспецифических антител	Антитела в асцитной жидкости		
		Наименование антител	мг/мл асцита	% ^a
14D6×36F9	Анти-Мб/HRP	Биспецифические антитела	0,31	17
		Антипероксидазные антитела	0,84	47
		Антимиоглобиновые антитела	0,65	36
		Сумма активного IgG (биспецифические+ антипероксидазные+ антимиоглобиновые антитела)	1,80	100
75G5×36F9	Анти-hIgG/HRP	Биспецифические антитела	2,93	36
		Антипероксидазные антитела	2,74	33
		Антитела к IgG человека	2,52	31
		Сумма активного IgG (биспецифические +антипероксидазные антитела к IgG человека)	8,19	100

^a - % по отношению к суммарному активному IgG (100%).

2. Теоретический анализ связывания антител с антигеном

2.1. Анализ равновесного связывания антител с антигеном в растворе.

В растворе наблюдаемая равновесная константа ассоциации (K_{ass}) взаимодействия антитело-антиген описывается следующим образом:

$$K_{\text{ass}} = \frac{[B]}{([Ab]_0 - [B])([Ag]_0 - [B])}, \quad (\text{M}^{-1}) \quad (1)$$

где $[Ab]_0$ - общая концентрация антител, (М); $[B]$ - концентрация связанных антител, (М); $[Ag]_0$ - общая концентрация антигена, (М). При этом обычно не учитывается то обстоятельство, что молекула антитела (подкласса IgG) несет два антигенсвязывающих сайта. Наиболее часто при анализе данных по взаимодействию антитело-антиген используют координаты Скэтчарда:

$$\frac{[B]}{[F]} = K_{\text{ass}} [Ag]_0 - K_{\text{ass}} [B], \quad (2)$$

где $[F]$ - концентрация свободных антител, иногда обозначаемая $[Ab]$, (М), $[F]=[Ab]=[Ab]_0-[B]$. Иногда данные представляют в более простой форме – в виде прямых связывания, в координатах $[B]$ от $[Ab]_0$. При низких значениях $[B]$ (следовательно $[Ag]_0 \gg [B]$) уравнение 1 может быть преобразовано:

$$[B] \approx \frac{K_{\text{ass}} [Ag]_0}{1 + K_{\text{ass}} [Ag]_0} [Ab]_0. \quad (3)$$

Координаты $[B]$ от $[Ab]_0$ (уравнение 3) часто используют в твердофазном ИФА, причем концентрацию связанных антител ($[B]$) представляют не в концентрационных единицах молярности, а в пропорциональных им единицах оптического поглощения.

2.2. Теоретический анализ связывания антител с иммобилизованным антигеном

На поверхности твердой фазы может существовать смесь бивалентно и моновалентно связанных молекул антител класса IgG (рис. 2).

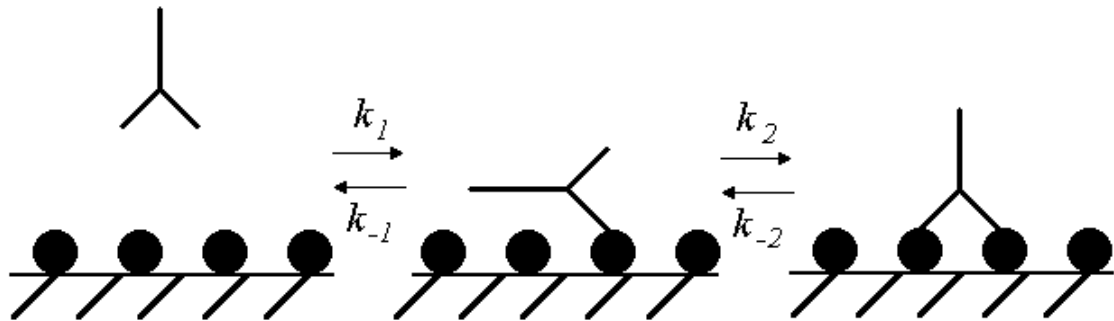


Рисунок 2. Модель бивалентного связывания антител.

Процесс моновалентного связывания характеризуется равновесной константой ассоциации (K_1):

$$K_1 = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[AbAg]_s}{2[Ab][Ag]_s}, \quad (\text{M}^{-1}) \quad (4)$$

где k_1 - кинетическая константа ассоциации антигенсвязывающего сайта антитела с антигеном, ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$); k_{-1} - кинетическая константа диссоциации моновалентного комплекса, (s^{-1}); $[Ag]_s$ - концентрация свободных антигенов на поверхности, (s - индекс, обозначающий поверхностную концентрацию (моль/см²), а отсутствие индекса означает концентрацию в растворе (М)); $[AbAg]_s$ - концентрация моновалентного комплекса

антитело-антиген. Процесс превращения моновалентного комплекса в бивалентный характеризуется равновесной константой ассоциации (K_2):

$$K_2 = \frac{k_2}{k_{-2}} = \frac{2[AbAg_2]_s}{[Ag]_s[AbAg]_s}, \text{ (см}^2\text{/моль)} \quad (5)$$

где k_2 - кинетическая константа превращения моновалентного комплекса в бивалентный, ($\text{см}^2\text{моль}^{-1}\text{с}^{-1}$); k_{-2} - кинетическая константа диссоциации бивалентного комплекса до моновалентного, (с^{-1}); $[AbAg_2]_s$ - концентрация бивалентного комплекса антитело-антиген. Статистический фактор два (2) возникает из-за того, что в уравнениях записывается не концентрация антител, а концентрация антигенсвязывающих сайтов антител.

Однако для количественной характеристики взаимодействия МКА с иммобилизованным антигеном используется упрощенная модель. В этой модели взаимодействие антитело-антиген рассматривается как гомогенный, равновесный, одноступенчатый процесс с однородной валентностью связывания. При этих допущениях применяются уравнения 1, 2 и 3. Теперь совместим модель бивалентного связывания (уравнения 4 и 5) с упрощенной моделью уравнения 1, тогда выражение для наблюдаемой равновесной константы ассоциации (K_{ass}) будет иметь следующий вид:

$$K_{ass} = \frac{1}{K_{diss}} = \frac{k_{ass}}{k_{diss}} = \frac{[AbAg_2]_s + [AbAg]_s}{[Ab][Ag]_s} = K_1(2 + K_2[Ag]_s), \text{ (M}^{-1}\text{)} \quad (6)$$

где K_{diss} - наблюдаемая равновесная константа диссоциации (M); k_{ass} - наблюдаемая кинетическая константа ассоциации, ($\text{M}^{-1}\text{с}^{-1}$); k_{diss} - наблюдаемая кинетическая константа диссоциации, (с^{-1}). Константы связывания антител с иммобилизованным антигеном (K_{ass} , K_{diss} и k_{diss}) являются эффективными, потому что могут зависеть от условий проведения эксперимента (например, от концентрации антигена на твердой фазе ($[Ag]_s$)).

2.3. Соотношение бивалентно и моновалентно связанных антител

При наличии бивалентного связывания родительских МКА с иммобилизованным антигеном из уравнения 5 можно вычислить соотношение бивалентно и моновалентно связанных антител:

$$\frac{[AbAg_2]_s}{[AbAg]_s} = \frac{K_2[Ag]_s}{2}. \quad (7)$$

Соотношение бивалентно и моновалентно связанных антител можно вычислить из уравнения 6, зная значение K_{ass} для биспецифических антител, равное K_1 , и значение K_{ass} для родительских МКА.

2.4. Кинетический анализ связывания антител с антигеном, иммобилизованным на твердой фазе

При определении кинетических констант ассоциации (k_{ass}) и диссоциации (k_{diss}) антител с иммобилизованным антигеном используется та же упрощенная модель, как и в уравнениях 1, 2 и 3 предполагающая гомогенное, одностадийное связывание с однородной валентностью. В этом случае скорость образования комплекса антиген-антитело выражается следующим уравнением:

$$\frac{d[B]}{dt} = k_{ass}[Ab][Ag] - k_{diss}[B], \quad (8)$$

где $[Ag]$ - концентрация свободного антигена ($[Ag]=[Ag]_0 - [B]$), а t - время (с). Кроме того, предполагается, что антитела находятся в избытке по отношению к антигену ($[Ab]_0$

$> > [Ag]_0$) и концентрация антител практически не меняется со временем ($[Ab] \approx [Ab]_0 = \text{const}$). Взаимодействие антиген-антитело происходит при условии псевдопервого порядка реакции, и в этом случае решение уравнения 8 записывается следующим образом:

$$[B] = [B]_{\infty} (1 - e^{-k_{on}t}), \quad (9)$$

где $[B]_{\infty}$ - равновесная концентрация комплекса антиген-антитело при данной концентрации антител ($[Ab]$), которая равна:

$$[B]_{\infty} = \frac{[Ab][Ag]_0}{[Ab] + K_{diss}}. \quad (10)$$

А k_{on} в уравнении 9 наблюдаемая константа скорости реакции (s^{-1}), которая равна:

$$k_{on} = k_{ass}[Ab] + k_{diss}. \quad (11)$$

Каждой концентрации антител ($[Ab]$) соответствуют определенные значения k_{on} и $[B]_{\infty}$. Из линейной зависимости уравнения 11 (k_{on} от $[Ab]$) определяется k_{ass} . Теоретически k_{diss} также может быть определена из уравнения 11.

Если считать диссоциацию необратимой, то есть предположить, что она происходит в достаточно большом объеме, и повторного связывания освободившихся антител не происходит, то тогда диссоциация описывается следующим уравнением:

$$\frac{d[B]}{dt} = -k_{diss}[B]. \quad (12)$$

Решение этого уравнения записывается следующим образом:

$$[B] = [B]_0 e^{-k_{diss}t}, \quad (13)$$

где $[B]_0$ - концентрация комплекса антиген-антитело в начальный момент времени.

2.5. Использование бивалентной модели для предсказания теоретически ожидаемых изменений наблюдаемой равновесной константы ассоциации (K_{ass}), параметров прямых связывания и наблюдаемых кинетических констант в зависимости от преимущественного характера связывания антител с иммобилизованным антигеном

Если бивалентное связывание МКА по каким-либо причинам невозможно и МКА связываются только моновалентно (то есть в уравнении 6 $K_2=0$), то K_{ass} для родительских МКА будет равна $2K_1$ (смотри уравнение 6). K_{ass} для БИАТ, у которых к данному антигену только одно плечо, в координатах Скэтчарда будет равна K_1 . Таким образом, если бивалентное связывание невозможно, K_{ass} для родительских МКА ($2K_1$) будет в два раза больше, чем K_{ass} для БИАТ (K_1). Если бивалентное связывание МКА возможно, то значение K_{ass} , как следует из уравнения 6, будет значительно больше $2K_1$ ($K_{ass} \gg 2K_1$).

Как показано ранее (раздел 2.1) кривую связывания (зависимость $[B]$ от $[Ab]_0$) при низких значениях $[B]$ можно линеаризовать в прямую. В координатах уравнения 3 ($[B]$ от $[Ab]_0$), коэффициент (тангенс угла наклона) прямой связывания равен $K_{ass}[Ag]_0/(1+K_{ass}[Ag]_0)$. При отсутствии бивалентного связывания наблюдаемая равновесная константа ассоциации (K_{ass}) для родительских МКА, равная $2K_1$, будет в два раза превышать K_{ass} для БИАТ, равную K_1 . Коэффициент прямой связывания родительских МКА будет равен $2K_1[Ag]_0/(1+2K_1[Ag]_0)$, а коэффициент прямой связывания БИАТ будет составлять $K_1[Ag]_0/(1+K_1[Ag]_0)$. Величина $[Ag]_0$ одинакова для родительских МКА и БИАТ. Следовательно, при отсутствии бивалентного связывания отношение коэффициентов прямых родительских МКА и БИАТ будет равно $(2+2K_1[Ag]_0)/(1+2K_1[Ag]_0)$. Преобразовав это выражение, получаем $1+1/(1+2K_1[Ag]_0)$. Очевидно, что это отношение не может превышать 2 и не может быть меньше 1. Если соотношение коэффициентов прямых связывания родительских МКА и БИАТ превышает

2, то это свидетельствует о наличии бивалентного связывания МКА с иммобилизованным антигеном.

Вышеприведенные уравнения позволяют также сравнить кинетические параметры связывания родительских МКА и БИАТ. Наблюдаемая кинетическая константа ассоциации (k_{ass}) для БИАТ равна k_1 из уравнения 4. Для родительских МКА величина k_{ass} в большинстве случаев не зависит от наличия или отсутствия бивалентного связывания и равна $2k_1$. Наблюдаемая кинетическая константа диссоциации (k_{diss}) для БИАТ равна k_{-1} . Значение k_{diss} для родительских антител выводится из уравнения 6:

$$k_{diss} = \frac{k_{-1}}{K_2[Ag]_s/2 + 1}. \quad (14)$$

Таким образом, диссоциация комплекса с родительскими МКА, которые могут бивалентно связываться с иммобилизованным антигеном, существенно меньше, чем диссоциация комплекса с БИАТ. Если бивалентное связывание МКА с иммобилизованным антигеном по каким-либо причинам невозможно, то диссоциация комплексов с родительскими МКА и с БИАТ будет одинакова.

3. Экспериментальный анализ связывания антител с иммобилизованным антигеном

Как показано теоретически, обычные МКА более эффективно взаимодействуют с иммобилизованным антигеном, чем образованные от них БИАТ. Для доказательства на экспериментальном уровне необходимы и достаточны, МКА связывающиеся с иммобилизованным антигеном преимущественно моновалентно, и МКА связывающиеся с иммобилизованным антигеном преимущественно бивалентно, и полученные от них биспецифические антитела.

Связывание антител с иммобилизованными антигенами было проанализировано тремя методами: ИФА, радиоиммунологическим (РИА) и с помощью биосенсора IAsys. Эти три метода были выбраны по следующим причинам. Иммуоферментный метод является наиболее распространенным, дешевым и простым в использовании, он активно используется в прикладных областях. Радиоиммунологический метод обладает широким диапазоном измеряемых концентрации ($>10^4$) и хорошей воспроизводимостью результатов. Этот метод является наиболее точным при определении наблюдаемой равновесной константы ассоциации (K_{ass}). Оптический биосенсор, основанный на принципе «резонансное зеркало» (IAsys), обладает важным преимуществом по сравнению с классическими методами анализа, какими являются РИА и ИФА, биосенсор дает возможность быстрого определения не только наблюдаемой равновесной константы ассоциации (K_{ass}), но и наблюдаемых кинетических констант ассоциации и диссоциации (k_{ass} и k_{diss}).

В настоящей работе была апробирована иммунологическая модель, предполагающая сравнительный анализ связывания родительских моноклональных антител и биспецифических моноклональных антител, для определения типа взаимодействия антител с иммобилизованным антигеном (моновалентного или бивалентного). В качестве инструмента для оценки аффинности моновалентного связывания использовали биспецифические моноклональные антитела. Также изучена возможность бивалентного связывания биспецифических моноклональных антител с различными антигенами одновременно иммобилизованными на твердой фазе.

3.1. Изучение связывания родительских и биспецифических антител с адсорбированными на твердой фазе антигенами иммуоферментным методом

Изучали антитела к трем антигенам: миоглобину (Мб), пероксидазе хрена (HRP) и IgG человека (hIgG); три клона обычных моноклональных антител (анти-Мб, анти-hIgG и анти-HRP) и два клона образованных от них биспецифических моноклональных антител (анти-Мб/HRP и анти-hIgG/HRP).

Эксперимент проводился в три стадии: на первой стадии к иммобилизованному антигену добавлялись родительские или биспецифические антитела; на второй стадии - антимышинные антитела, конъюгированные с биотином; на третьей - авидин, конъюгированный с щелочной фосфатазой (рис. 3). Реакцию проводили с гексагидратом п-нитрофенилфосфата натрия в диэтаноламиновом буфере. Измеряли оптическое поглощение (A_{405}).

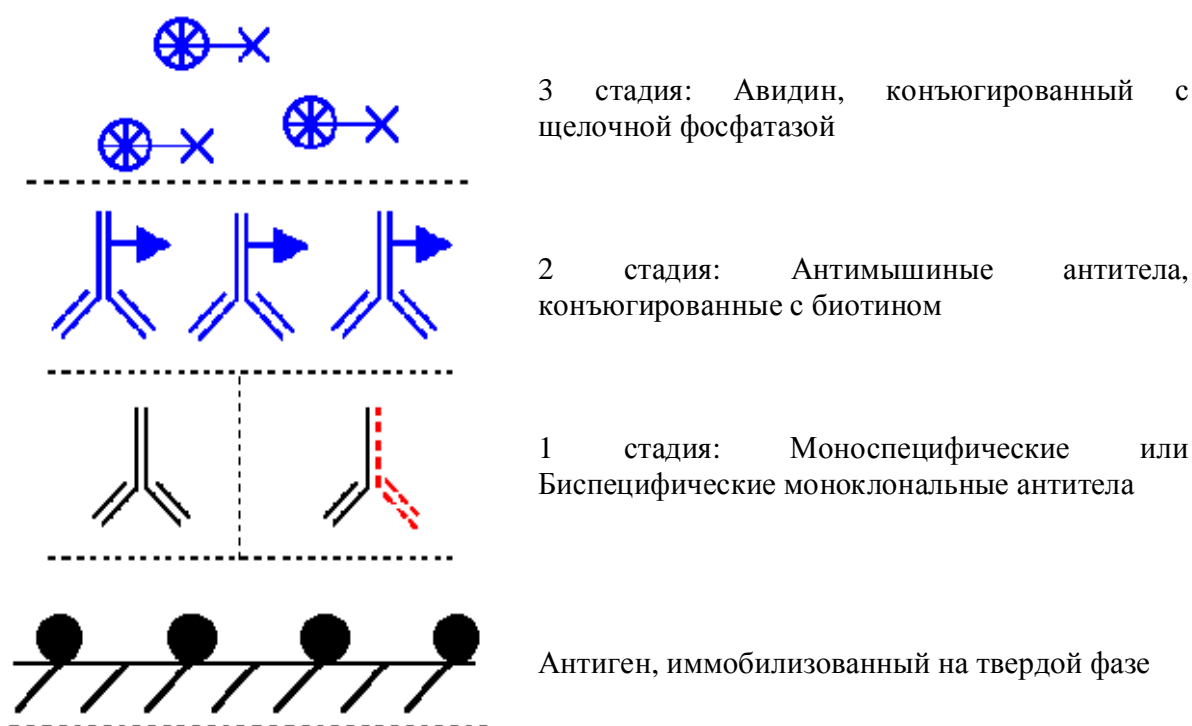


Рисунок 3. Схема проведения эксперимента иммуноферментным методом.

Одним из используемых в работе антигенов был иммуноглобулин G человека. При этом в используемых нами антимышинных овечьих антителах, меченых биотином, была фракция, которая связывалась также с иммуноглобулином G человека (перекрестное антивидовое связывание). Для устранения этой фракции антимышинные антитела, меченые биотином, аффинно очищались на сефарозе, конъюгированной с иммуноглобулином G человека. Во всех экспериментах использовалась только та фракция антимышинных овечьих антител, меченых биотином, которая не связывалась с сефарозой, конъюгированной с иммуноглобулином G человека. Поскольку все анализируемые антитела относились к подклассу IgG1 мыши, можно полагать, что все антитела настоящей панели одинаково воспринимались выбранной антивидовой системой тестирования.

Изучали зависимость поглощения (A_{405}) от общей концентрации антител ($[Ab]_0$). Поскольку поглощение пропорционально концентрации иммунохимического комплекса

([B]), то теоретические представления о соотношении коэффициентов прямых связывания из уравнения 3, сделанные в разделе 2.5, верны и для коэффициентов, связывающих A_{405} и $[Ab]_0$.

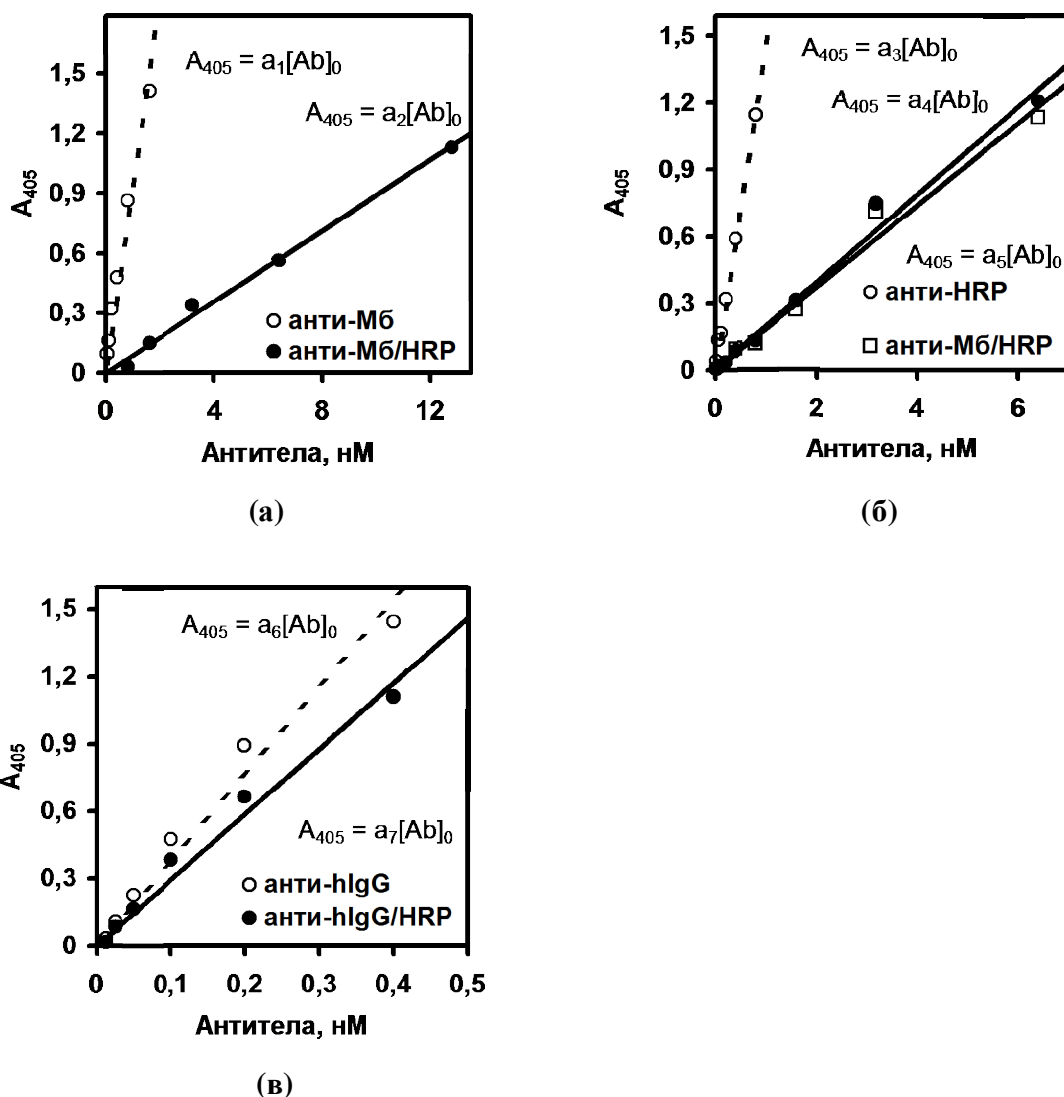


Рисунок 4. Связывание с адсорбированными миоглобином (а), пероксидазой (б) и IgG1 человека (в) родительских и биспецифических моноклональных антител. Анализ данных проводили в координатах A_{405} от $[Ab]_0$, аналогичных координатам уравнения 3.

Полученные иммуноферментным методом прямые связывания родительских МКА и БИАТ с антигенами, адсорбированными на твердой фазе, представлены на рис. 4. Можно видеть, что с Мб связывается в 10 раз больше родительских МКА, чем БИАТ (рис. 4 а), коэффициент a_1 равен 0,95, а коэффициент a_2 равен 0,09. Существенная разница в связывании родительских МКА и БИАТ наблюдается и для адсорбированной пероксидазы: с HRP связывается в 7.5 раз больше родительских МКА, чем БИАТ. (рис. 4 б), коэффициент a_3 равен 1,45, коэффициент a_4 равен 0,2, а коэффициент a_5 равен 0,18. БИАТ, полученные от разных клонов, но несущие одинаковый сайт связывания с HRP (специфичность анти-Мб/HRP и анти-hIgG/HRP) связываются с пероксидазой практически идентично (рис. 4 б). На основании теоретических представлений о соотношении коэффициентов прямых связывания (см. раздел 2.5) можно сделать вывод о наличии бивалентного связывания с антигенами в случае антимиоглобиновых и антипероксидазных МКА. Вместе с тем, разница в связывании родительских МКА и БИАТ с hIgG1 невелика (рис. 4 в). В этом случае соотношение коэффициентов прямых

связывания МКА и БИАТ составляет всего лишь 1,3, коэффициент a_6 равен 3,85, а коэффициент a_7 равен 2,94. Как показано в теоретическом разделе 2.5, это может свидетельствовать об отсутствии бивалентного связывания родительских МКА с иммобилизованным иммуноглобулином G человека (hIgG1).

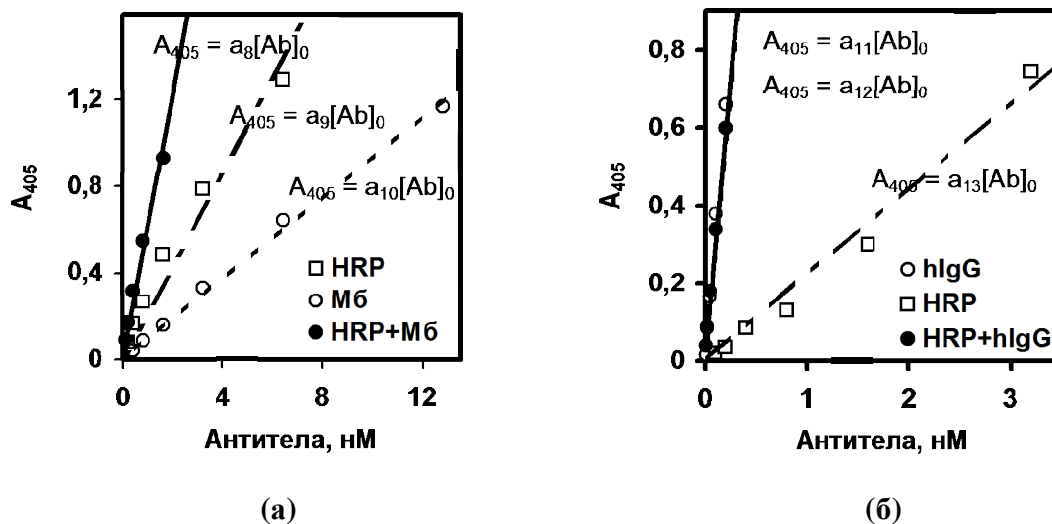


Рисунок 5. Связывание биспецифических моноклональных антител: анти-Мб/HRP (а) и анти-hIgG/HRP (б), с адсорбированными антигенами и их смесью в молярном соотношении 1:1. Анализ данных проводили в координатах A_{405} от $[Ab]_0$, аналогичных координатам уравнения 3.

Кроме того, для БИАТ (анти-Мб/HRP и анти-hIgG/HRP) было исследовано связывание при одновременной адсорбции на твердой фазе смеси двух антигенов: HRP и Mb; HRP и hIgG (молярное соотношение адсорбируемых антигенов в насыщающем растворе 1:1). Величина коэффициентов прямых связывания показывает, что с двумя антигенами, адсорбированными на твердой фазе, связывается в 2.8 раза больше БИАТ анти-Мб/HRP, чем при индивидуальной адсорбции HRP, и в 6.6 раз больше антител, чем при индивидуальной адсорбции Mb (рис. 5 а), коэффициент a_8 равен 0,62, коэффициент a_9 равен 0,22, а коэффициент a_{10} равен 0,09. В то же время для БИАТ анти-hIgG/HRP (рис. 5 б) величина коэффициентов прямых связывания показывает, что с двумя антигенами, адсорбированными на твердой фазе, связывается такое же количество антител, как и при индивидуальной адсорбции hIgG, и в 13 раз больше антител, чем при индивидуальной адсорбции HRP, коэффициент a_{11} равен 2,84, коэффициент a_{12} равен 2,93, а коэффициент a_{13} равен 0,22.

Таким образом, с двумя антигенами (HRP и Mb), одновременно адсорбированными на твердой фазе, БИАТ анти-Мб/HRP связываются гораздо эффективнее, чем с HRP или Mb, адсорбированными индивидуально. Это свидетельствует о том, что часть молекул БИАТ связалась бивалентно: соответствующие сайты связались одновременно с двумя адсорбированными антигенами (рис. б). Соотношение коэффициентов (рис. 5 а) свидетельствует о наличии бивалентного связывания, даже если предположить, что миоглобин и пероксидаза имеют различные, не пересекающиеся центры связывания на поверхности полистироловых планшетов. Наши данные стоят в одном ряду с более ранними наблюдениями об усилении лизиса клеток и

авидности связывания при использовании БИАТ, способных связываться одновременно с двумя различными антигенами клеточной поверхности. А БИАТ анти-hIgG/HRP с двумя антигенами, одновременно адсорбированными на твердой фазе, связываются почти с такой же интенсивностью, как и с индивидуально адсорбированным hIgG1 (рис. 5 б). Это



свидетельствует о том, что БИАТ анти-hIgG/HRP с двумя одновременно адсорбированными антигенами связываются только моновалентно.

Рисунок 6. Схема бивалентного связывания биспецифических моноклональных антител с двойной специфичностью к Мб и к HRP с адсорбированными на твердой фазе антигенами (пероксидазой и миоглобином).

3.2. Изучение связывания антител с адсорбированными на твердой фазе антигенами радиоиммунологическим методом

С помощью иммуноферментного метода сложно определить равновесные константы связывания антител с иммобилизованным антигеном, поэтому для решения этих задач использовался радиоиммунологический метод. Этот метод является наиболее точным при определении наблюдаемой равновесной константы ассоциации (K_{ass}).

Для экспериментов использовали БИАТ и МКА, меченные ^{125}I . Данные РИА по связыванию представляли в координатах: концентрация связанных антител от концентрации общих антител (уравнение 3) или в координатах Скэтчарда (уравнение 2). Данные РИА в координатах уравнения 3 являются аналогом прямых связывания в твердофазном ИФА.

Кривые связывания, представленные на рис. 7 и 8 а, показывают, что существенная разница в связывании с Мб и HRP между родительскими МКА и БИАТ имеет место и при тестировании связывания радиоиммунологическим методом. По величине коэффициентов прямых связывания можно рассчитать, что с Мб на твердой фазе связывается в 5.3 раза больше родительских МКА, чем БИАТ анти-Мб/HRP (рис. 7). С иммобилизованной HRP родительских антипероксидазных МКА связывается в 2.2 раза больше, чем БИАТ анти-Мб/HRP, и в 2.9 раза больше, чем БИАТ анти-hIgG/HRP (рис. 8 а). Соотношение коэффициентов прямых связывания родительских МКА и БИАТ в случае иммобилизованных Мб и HRP больше двух, что позволяет сделать выводы о наличии бивалентного связывания МКА с пероксидазой и миоглобином (раздел 2.5). Для иммобилизованного hIgG1 (рис. 9 а) отношение коэффициентов прямых связывания

родительских МКА и БИАТ составляет 1.4 (меньше 2). Это может свидетельствовать об отсутствии бивалентного связывания родительских МКА с иммобилизованным hIgG1. Таким образом, данные, полученные РИА, подтверждают выводы сделанные при сравнении связывания МКА и БИАТ твердофазным ИФА.

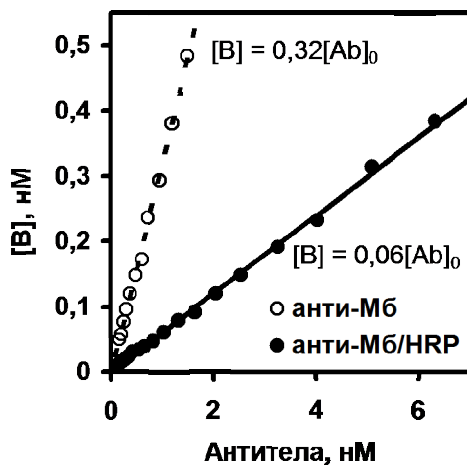


Рисунок 7. Связывание с адсорбированным миоглобином родительских и биспецифических моноклональных антител. Анализ данных проводили в координатах уравнения 3.

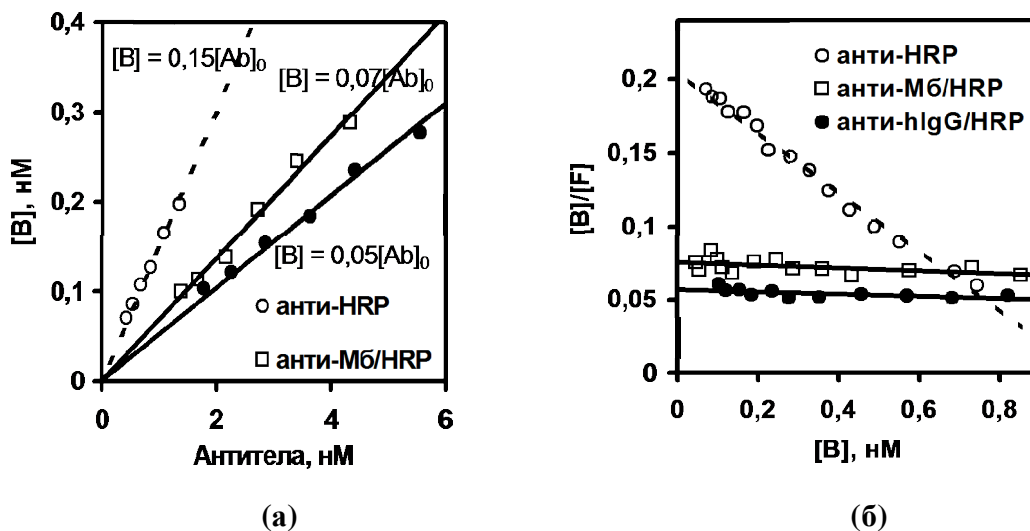


Рисунок 8. Связывание с адсорбированной пероксидазой родительских и двух видов биспецифических моноклональных антител. Анализ данных проводили в координатах уравнения 3 (а) и в координатах Скэтчарда (б).

Способность МКА бивалентно связываться с иммобилизованным антигеном во многом зависит от стерического взаимодействия антигенсвязывающего сайта МКА с соответствующим эпитопом антигена. Отсутствие бивалентного связывания с hIgG1 можно объяснить относительно большими размерами молекулы hIgG (M_r hIgG в четыре раза больше чем M_r пероксидазы и в 9 раз больше, чем M_r миоглобина). Кроме того, молекулы пероксидазы и миоглобина имеют глобулярную структуру, а молекула hIgG,

имеет более сложную структуру, состоящую из четырех цепей (рис. 1), что также может сказываться на характере связывания. В работе Довера в 1984 году показано, что различные МКА, специфичные к одному антигену, могут показывать различные режимы связывания: и бивалентный, и моновалентный. Следовательно, наличие или отсутствие бивалентного связывания антител с иммобилизованным антигеном необходимо доказывать не только для каждого антигена, но и для каждого клона-продуцента МКА к данному антигену.

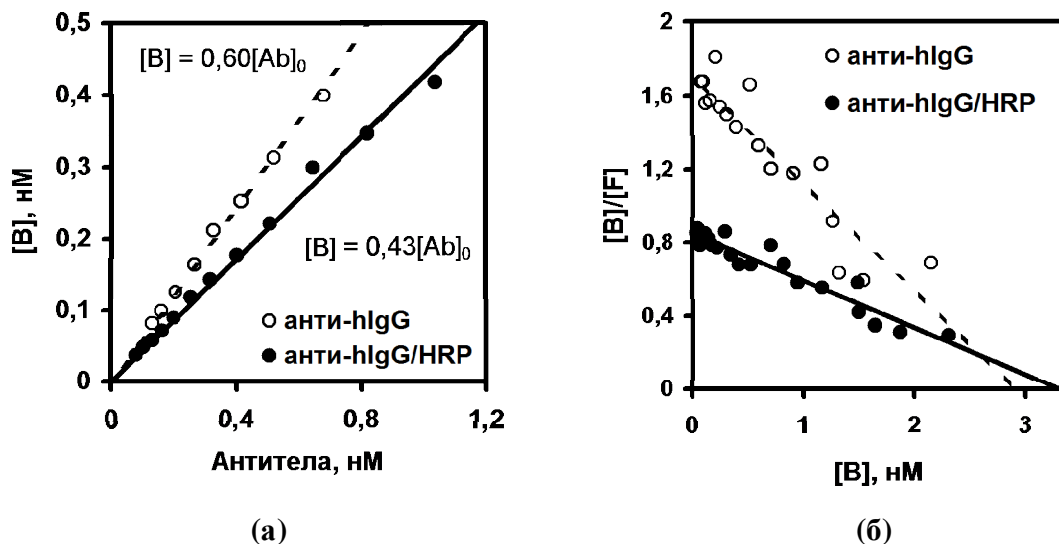


Рисунок 9. Связывание с адсорбированным hIgG1 родительских и биспецифических моноклональных антител. Анализ данных проводили в координатах уравнения 3 (а) и в координатах Скэтчарда (б).

Следует отметить, что при представлении прямых связывания в координатах уравнения 3 в твердофазном ИФА различие в связывании между родительскими МКА и БИАТ для иммобилизованных Мб и HRP больше, чем в РИА (рис. 4 а и 4 б, рис. 7 и 8 а). Для того чтобы объяснить это явление, следует учесть, что ИФА (в нашем случае) включает в себя три последовательных инкубации: с родительскими МКА или БИАТ, с антимишинными антителами, мечеными биотином, и с авидином, конъюгированным со щелочной фосфатазой. А в РИА имеет место всего одна инкубация: с мечеными родительскими МКА или БИАТ. При этом возможна диссоциация антител на каждом этапе инкубации, причем при наличии бивалентного связывания родительские МКА будут диссоциировать медленнее, чем БИАТ (раздел 2.5). При наличии бивалентного связывания отношение коэффициентов прямых связывания родительских МКА и БИАТ должно быть больше при многостадийных инкубациях, чем при одностадийной инкубации. При отсутствии бивалентного связывания отношение коэффициентов прямых связывания родительских МКА и БИАТ должно быть одним и тем же при одностадийной (РИА) и многостадийной (ИФА) инкубациях, так как диссоциация комплексов с родительскими МКА и с БИАТ в этом случае будет одинакова (раздел 2.5). Этот вывод подтверждается при сравнении связывания между родительскими МКА и БИАТ с иммобилизованным hIgG1 (рис. 4 в и 9 а).

Для определения наблюдаемой равновесной константы ассоциации (K_{ass}) данные, полученные с помощью РИА, были представлены в координатах Скэтчарда (рис. 8 б и 9 б, табл. 3). Как можно видеть из таблицы 3, K_{ass} родительских антипероксидазных антител в 38 раз превышает K_{ass} антипероксидазного сайта БИАТ с двойной

специфичностью к HRP и hIgG и в 21 раз превышает K_{ass} антипероксидазного сайта БИАТ, специфичных к HRP и Мб (рис. 8 б). Следует обратить внимание, что K_{ass} антипероксидазного сайта БИАТ, специфичных к HRP и Мб, в 1.8 раз превышает K_{ass} антипероксидазного сайта БИАТ со специфичностью к HRP и hIgG, что лежит в пределах погрешности определения K_{ass} твердофазным радиоиммунологическим методом.

Таблица 3. Наблюдаемые равновесные константы ассоциации (K_{ass}) родительских моноклональных и биспецифических моноклональных антител с антигеном, адсорбированным на твердой фазе

Клеточная линия	Специфичность антител	Антиген на твердой фазе	K_{ass}, M^{-1}
36F9	Анти-HRP	HRP	$(2,0 \pm 0,1) \times 10^8$
36F9×14D6	Анти-Мб/HRP	HRP	$(9,6 \pm 0,8) \times 10^6$
36F9×75G5	Анти-hIgG/HRP	HRP	$(5,3 \pm 0,5) \times 10^6$
75G5	Анти-hIgG	hIgG1	$(5,9 \pm 0,6) \times 10^8$
36F9×75G5	Анти-hIgG/HRP	hIgG1	$(2,6 \pm 0,2) \times 10^8$

Зная соотношение констант, из уравнений 6 и 7 (разделы 2.2 и 2.3) для родительских МКА можно рассчитать соотношение бивалентно и моновалентно связанных антител. Это соотношение составляет 9 и 18, в зависимости от того, значение K_{ass} каких БИАТ (анти-Мб/HRP или анти-hIgG/HRP), считать истинной аффинностью антипероксидазного сайта антител. Следовательно, при данной плотности антигена и в данном диапазоне начальных концентраций антител около 90-95% от общего числа связанных родительских МКА ассоциировано бивалентно и только около 5-10% моновалентно.

В случае hIgG1, адсорбированного на твердой фазе (рис. 9 б), K_{ass} родительских МКА в 2.3 раза выше, чем K_{ass} анти-hIgG сайта БИАТ (табл. 3). Соотношение K_{ass} МКА и БИАТ в данном случае подтверждает вывод, сделанный на основе сравнения прямых связывания, об отсутствии бивалентного связывания родительских МКА с иммобилизованным hIgG1. Действительно, теоретически, при отсутствии бивалентного связывания K_{ass} для родительских МКА должна быть в 2 раза больше, чем K_{ass} для БИАТ (раздел 2.5). Различие между теоретической и экспериментальной величинами K_{ass} лежит в пределах погрешности определения наблюдаемой равновесной константы ассоциации РИА.

3.3. Анализ параметров связывания антител с иммобилизованными антигенами с помощью биосенсора IAsys

Сравнительный анализ связывания родительских МКА и БИАТ с иммобилизованным антигеном с помощью биосенсора IAsys, основанного на принципе «резонансное зеркало», имеет важный методический аспект. На эту тему нами написана протокольная статья, предварительно заказанная у нас одним из редакторов американского журнала иммунологических методов (Journal of Immunological Methods). Важным преимуществом биосенсора IAsys по сравнению с классическими методами

анализа, какими являются РИА и ИФА, является возможность быстрого определения не только наблюдаемой равновесной константы ассоциации (K_{ass}), но и наблюдаемых кинетических констант ассоциации и диссоциации (k_{ass} и k_{diss}). Биосенсор позволяет следить за иммунологическим взаимодействием на границе раздела фаз, непосредственно в то время, когда оно происходит, без использования меченых реагентов. Принцип действия IAsys заключается в следующем: поверхность биосенсора освещают лазером, при этом в поверхностном слое возникает быстро затухающее поле, позволяющее детектировать малейшие изменения массы поверхностного слоя биосенсора. Например, при иммунологической реакции антител с иммобилизованным антигеном масса поверхностного слоя увеличивается, и соответствующим образом увеличивается регистрируемый биосенсором сигнал. Регистрируемым сигналом в биосенсоре является угол при котором происходит «резонанс», измеряемый в секундах (в одном градусе 60 минут, в одной минуте 60 секунд).

Анализируемая панель антител включала два типа родительских МКА (анти-HRP и анти-hIgG) и один тип, полученных от них БИАТ (анти-hIgG/HRP). На рисунке 10 представлена суперпозиция нескольких экспериментальных кривых ассоциации антител с антигеном для 5 различных концентраций. Видно, что скорость реакции (k_{on}) увеличивается при увеличении концентрации антител.

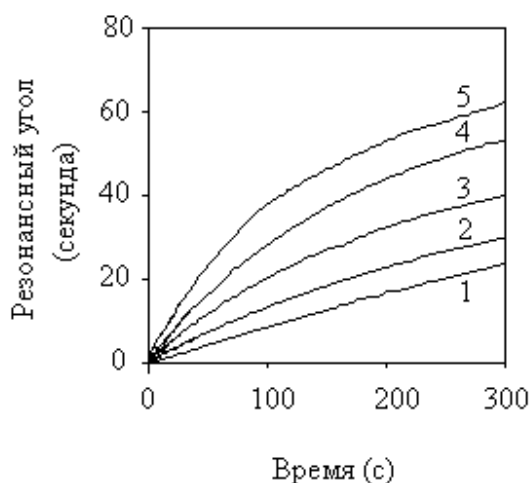


Рисунок 10. Пять кривых ассоциации антител (анти-hIgG/HRP) с иммобилизованным антигеном (HRP). Эти данные используются для расчета k_{on} для каждой концентрации антител с помощью уравнения 11. Кривые 1-5 соответствуют концентрациям антител равным: 80 нМ; 160 нМ; 240 нМ; 328 нМ и 488 нМ.

Для обработки, преобразования и обсчета экспериментальных данных, полученных с помощью биосенсора IAsys использована специальная программа FASTfit. Уравнение 9, описывающее ассоциацию антител с иммобилизованным антигеном при псевдопервом порядке реакции (раздел 2.4), в программе FASTfit преобразуется следующим образом:

$$R = R_0 + E(1 - e^{-k_{on}t}) \quad (15),$$

где R_0 – сигнал, при $t=0$. Эта величина специально вводится, чтобы скорректировать изменение концентрации белка в поверхностном слое после добавления раствора антител. Параметр E называется степенью реакции и аналогичен $[B]_{\infty}$ в уравнениях 9 и 10.

В настоящих экспериментах диффузионные ограничения не являлись лимитирующим фактором, так как начальная скорость связывания (наклон кривой в первые 20 с ассоциации) не изменялась при изменении интенсивности перемешивания при 40%, 65% и 85%. В то время как при изменении интенсивности перемешивания до 1% начальная скорость связывания падала более чем на порядок.

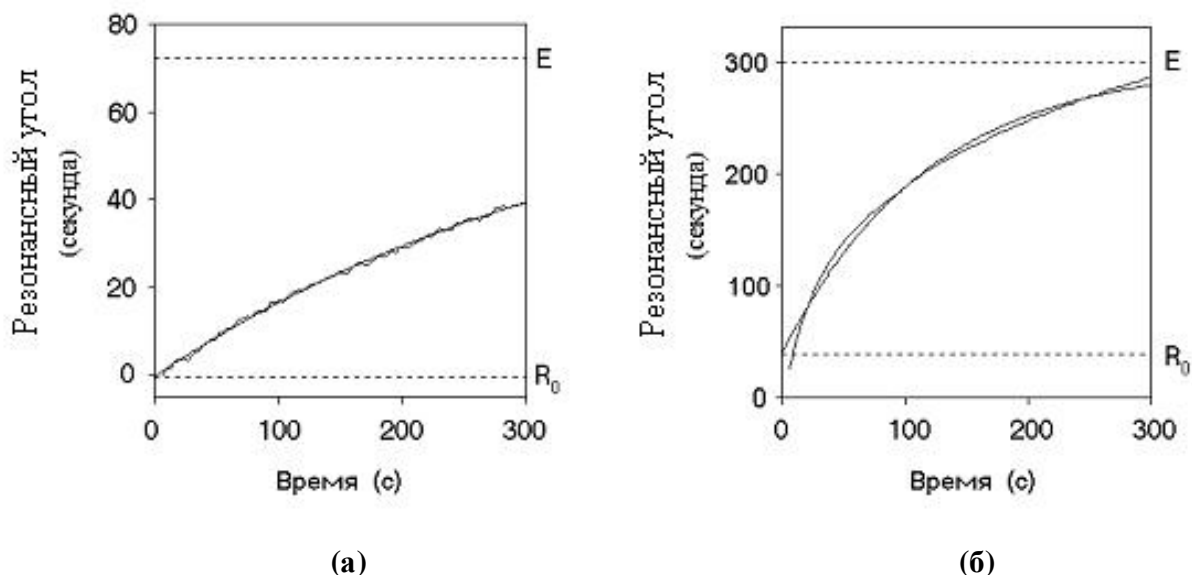


Рисунок 11. Анализ ассоциации антител с иммобилизованным антигеном. (а) Сравниваются экспериментальные данные по ассоциации 7 нМ МКА с иммобилизованным hIgG1 (изломанная линия) и кривая уравнения 15 (гладкая линия). (б) Сравниваются экспериментальные данные по ассоциации 1031 нМ БИАТ с иммобилизованным hIgG1 (изломанная линия) и проведенная кривая уравнения 15 (гладкая линия).

Рисунок 11 а показывает, что при корректном выборе концентрации антител экспериментальные данные по ассоциации совпадают с кривой уравнения 15. Рассчитанная величина k_{on} равна $(1,98 \pm 0,09) \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$, величина E равна 73 ± 2 секунд, величина R_0 равна $-0,8 \pm 0,1$ секунд, величина $\chi^2 = 0,24$. Из нашего опыта можно сделать наблюдение о том что, для того чтобы экспериментальная кривая ассоциации хорошо описывалась уравнением 15, ее необходимо получать при относительно невысоких концентрациях антител, при которых сигнал биосенсора не превышает 80 секунд за 5 мин. Оптимальная конечная концентрация антител должна быть близка K_{diss} . На рисунке 11 б кривые не совпадают. Рассчитанная величина k_{on} равна $(8,44 \pm 0,29) \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$, величина E равна 260 ± 3 секунд, величина R_0 равна $39,3 \pm 2,7$ секунд, величина $\chi^2 = 36,1$. При высоких концентрациях антител ($>10K_{diss}$), либо при длительном периоде анализа (>5 мин), экспериментальные кривые перестают описываться уравнением 15. При этом более чем на порядок возрастает величина R_0 и на два порядка возрастает величина ошибки χ^2 (рис. 11 б). χ^2 – хи-квадрат, величина, минимизируемая при регрессионном анализе экспериментальных данных. Для двух близких по количеству точек массивов экспериментальных данных, обрабатываемых с помощью определенного уравнения, величина χ^2 должна быть одного порядка, в том случае если оба массива экспериментальных данных хорошо описываются этим уравнением. В том случае если один массив экспериментальных данных плохо описывается определенным уравнением, по сравнению с другим массивом, величины χ^2 для этих массивов различаются более чем

на порядок. Несовпадение экспериментальных данных с кинетикой псевдо-первого порядка возникает из-за нескольких причин. Первая причина – это гетерогенность антигена. При иммобилизации антиген связывается с матрицей различными своими участками, также происходит частичная инактивация некоторых молекул антигена. Вторая причина – это стерические эффекты в карбоксиметилированном декстране. Ведь обычно отклонения наблюдаются при высоких концентрациях антител. В некоторых случаях отклонения могут быть связаны с более сложным механизмом иммунологического взаимодействия (например, конформационные изменения, кооперативный эффект, поливалентное взаимодействие) и рассчитываются по более сложным моделям.

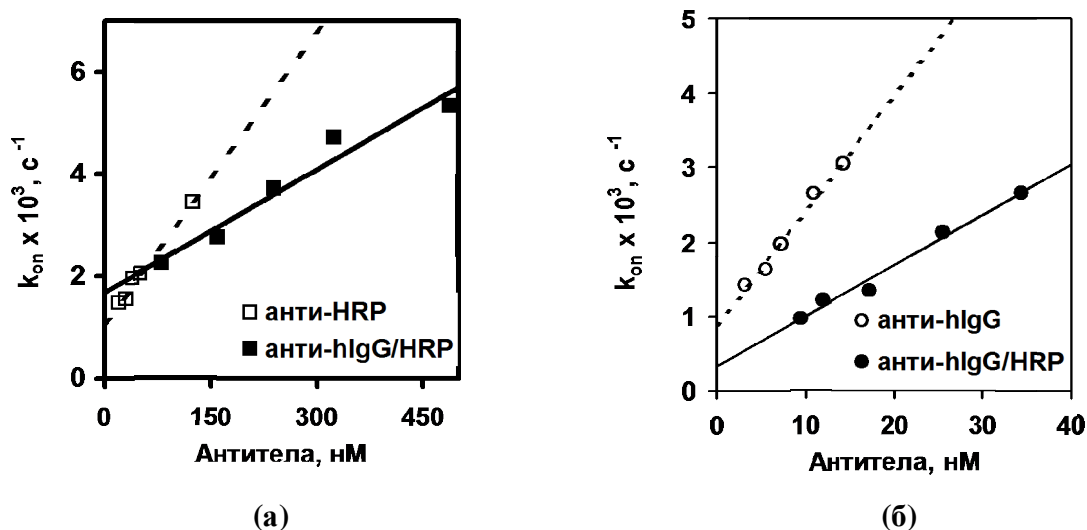


Рисунок 12. Зависимость k_{on} от концентрации антител. а) Концентрационная зависимость k_{on} для связывания родительских антипероксидазных МКА и БИАТ с иммобилизованным HRP. б) Концентрационная зависимость k_{on} для связывания родительских антител против hlgG и БИАТ с иммобилизованным hlgG1.

Для каждого антитела k_{ass} рассчитывалась построением линейной зависимости k_{on} от $[Ab]_0$ (уравнение 11). Тангенс угла наклона получаемых прямых равен наблюдаемой кинетической константе ассоциации (k_{ass}) из уравнения 11. k_{on} для каждой концентрации антител был рассчитан по уравнению 15. Типичные зависимости представлены на рисунках 12 а и 12 б. При высоких концентрациях антител ($>10K_{diss}$) получаемая из экспериментальных кривых ассоциации величина k_{on} иногда имеет заниженную величину. Это заметно при расчете k_{ass} по уравнению 11, так как получаемые при высоких концентрациях антител k_{on} имеют меньшую величину, чем предсказывается другими экспериментальными точками. Подобные значения k_{on} отбрасывались, а окончательная величина k_{ass} рассчитывалась из оставшихся данных (табл. 4). Это явление, возможно, объясняется насыщением антигенных эпитопов при высокой концентрации антител.

Экспериментальные данные по диссоциации иммунохимического комплекса обсчитывались с помощью уравнения 13. На рисунке 13 кривые совпадают. Рассчитанная величина k_{diss} равна $(8,7 \pm 0,1) \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, а величина V_0 равна $58,9 \pm 0,1$ секунд.

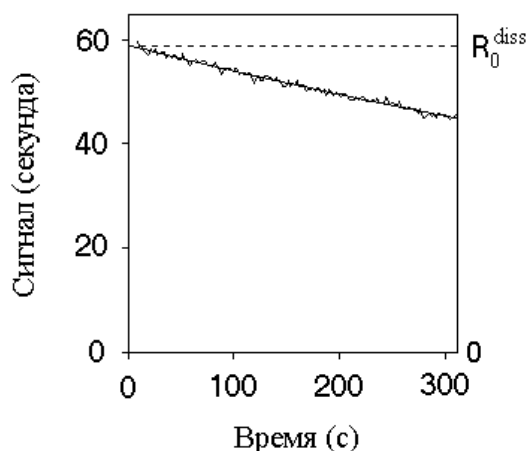


Рисунок 13. Анализ диссоциации иммунохимического комплекса. Сравниваются экспериментальные данные по диссоциации 488 нМ БИАТ с иммобилизованным HRP (изломанная линия) и кривая уравнения 13 (гладкая линия).

Таблица 4. Параметры связывания антител с иммобилизованными антигенами, измеренные с помощью оптического биосенсора.

Специфичность антител	Иммобилизованный антиген	Оптический биосенсор, IAsys		
		$k_{ass}, \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$	k_{diss}, c^{-1}	$K_{ass}=k_{ass}/k_{diss}, \text{M}^{-1}$
Анти-HRP	HRP	$(1,9 \pm 0,1) \times 10^4$	$(4,0 \pm 0,1) \times 10^{-5}$	$(4,8 \pm 0,3) \times 10^8$
Анти-hIgG/HRP	HRP	$(8,0 \pm 1,0) \times 10^3$	$(8,3 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	$(9,6 \pm 1,2) \times 10^6$
Анти-hIgG	hIgG1	$(1,5 \pm 0,2) \times 10^5$	$(2,7 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	$(5,6 \pm 0,8) \times 10^8$
Анти-hIgG/HRP	hIgG1	$(6,8 \pm 0,5) \times 10^4$	$(3,0 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	$(2,3 \pm 0,5) \times 10^8$

Значение k_{ass} антипероксидазных МКА в 2,4 раза больше, чем k_{ass} антипероксидазного сайта БИАТ (табл. 4). А значение k_{ass} родительских МКА против hIgG в 2,2 раза больше, чем k_{ass} анти-hIgG сайта БИАТ (табл. 4, рис. 12 б). Теоретически k_{ass} родительских МКА должна быть в 2 раза больше, чем k_{ass} БИАТ (раздел 2.5). Различие между теоретической и экспериментальной величинами k_{ass} не превышает погрешностей определения (табл. 4). Вместе с тем, k_{diss} антипероксидазного сайта БИАТ в

21 раз больше, чем k_{diss} антипероксидазных МКА (табл. 4), а K_{ass} антипероксидазных МКА в 50 раз превышает K_{ass} антипероксидазного сайта БИАТ, что подтверждает вывод, сделанный при анализе иммуноферментным и радиоиммунологическим методами, о том, что антипероксидазные МКА связываются с иммобилизованной HRP бивалентно (раздел 2.5). С другой стороны диссоциация родительских МКА против hIgG и анти-hIgG сайта БИАТ практически одинакова (табл. 4), что подтверждает вывод об отсутствии бивалентного связывания родительских МКА с иммобилизованным hIgG1 (раздел 2.5). K_{ass} родительских МКА против hIgG, определяемая с помощью биосенсора, в 2,4 раза превышает K_{ass} анти-hIgG сайта БИАТ, что близко к теоретически ожидаемому (раздел 2.5).

Следует заметить, что равновесные константы ассоциации (K_{ass}) антител, определяемые в биосенсоре, хорошо коррелируют с константами, определенными с помощью радиоиммунологического метода (табл. 3 и 4), несмотря на различные способы иммобилизации антигена (ковалентное связывание в биосенсоре и адсорбция на иммунологических планшетах в радиоиммунологическом методе). Это свидетельствует о близости поверхностных концентраций сохранившего иммунологическую активность антигена в обоих методах.

ВЫВОДЫ

1. Получены аффинно-очищенные моноклональные антимиоглобиновые антитела, антипероксидазные антитела, антитела против иммуноглобулина G человека и образованные от них моноклональные биспецифические антитела со специфичностью к миоглобину и пероксидазе хрена и со специфичностью к иммуноглобулину G человека и пероксидазе хрена.

2. Теоретическое рассмотрение закономерностей взаимодействия обычных моноклональных антител и образованных от них биспецифических моноклональных антител с иммобилизованными антигенами позволяет сделать следующие выводы:

а) наблюдаемая равновесная константа ассоциации родительских антител по крайней мере в два раза превышает наблюдаемую равновесную константу ассоциации биспецифических антител вне зависимости от характера связывания с иммобилизованным антигеном, моновалентного или бивалентного;

б) коэффициент (тангенс угла наклона) прямой связывания родительских антител больше, чем коэффициент прямой связывания биспецифических антител вне зависимости от характера связывания с иммобилизованным антигеном;

в) наблюдаемая кинетическая константа ассоциации родительских антител в два раза превышает наблюдаемую кинетическую константу ассоциации биспецифических антител вне зависимости от характера связывания с иммобилизованным антигеном;

г) наблюдаемые кинетические константы диссоциации родительских и биспецифических антител совпадают, если родительские антитела связываются с иммобилизованным антигеном только моновалентно; если же родительские антитела связываются с иммобилизованным антигеном бивалентно, то их наблюдаемая кинетическая константа диссоциации меньше, чем наблюдаемая кинетическая константа диссоциации биспецифических антител.

3. Экспериментальное рассмотрение иммунохимических взаимодействий с участием иммобилизованных антигенов: пероксидазы, миоглобина и иммуноглобулина G человека, аффинно-очищенных моноклональных и образованных от них биспецифических антител с использованием трех различных методов: иммуноферментного, радиоиммунологического и биосенсора IAsys, подтверждает

выводы, сделанные при теоретическом рассмотрении закономерностей иммунохимического взаимодействия, и позволяет установить что:

а) антимиоглобиновые и антипероксидазные антитела связываются с иммобилизованным антигеном преимущественно бивалентно;

б) антитела против иммуноглобулина G человека связываются с иммобилизованным антигеном преимущественно моновалентно;

в) 90-95% от общего числа связавшихся с иммобилизованным антигеном антипероксидазных антител ассоциировано бивалентно и около 5-10% моновалентно.

4. Определены наблюдаемые равновесные и кинетические константы ассоциации и диссоциации антипероксидазных антител, антител против иммуноглобулина G человека и образованных от них моноклональных биспецифических антител со специфичностью к миоглобину и пероксидазе хрена и со специфичностью к иммуноглобулину G человека и пероксидазе хрена с иммобилизованными пероксидазой и иммуноглобулином G человека.

5. Предложена и апробирована тремя различными методами иммунологическая модель, предполагающая сравнительный анализ связывания с иммобилизованным антигеном моноклональных антител и образованных от них биспецифических моноклональных антител, для определения характера взаимодействия антител с иммобилизованным антигеном (моновалентного или бивалентного).

6. Показано бивалентное связывание биспецифических антител со специфичностью к пероксидазе и миоглобину при одновременной адсорбции на поверхности иммунных планшетов смеси двух антигенов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Dmitriev, D.A., Massino, Yu.S., Smirnova, M.B., Segal, O.L., Kolyaskina, G.I., Pavlova, E.V., Osipov, A.P., Egorov, A.M., and Dmitriev, A.D. (2001) The comparison of the ability of monoclonal antibodies directed to different proteins (human IgG, human myoglobin and HRP) and bispecific antibodies derived thereof to bind antigens immobilized on a surface of a solid phase. *Clinica Chimica Acta*, 309, 57-71.

2. Osipov, A.P., Dmitriev, D.A., and Egorov, A.M. Analysis of the binding of bispecific monoclonal antibodies with immobilized antigens (human IgG and horseradish peroxidase) using a resonant mirror biosensor. *Biocatalysis 2002: Fundamentals and Applications*. Moscow, Russia, June 10-15, 2002, p. 44.

3. Dmitriev, D.A., Massino, Yu.S., Segal, O.L., Smirnova, M.B., Pavlova, E.V., Gurevich, K.G., Gnedenko, O.V., Ivanov, Yu.D., Kolyaskina, G.I., Archakov, A.I., Osipov, A.P., Dmitriev, A.D., and Egorov, A.M. (2002) Analysis of the binding of bispecific monoclonal antibodies with immobilized antigens (human IgG and horseradish peroxidase) using a resonant mirror biosensor. *Journal of Immunological Methods*, 261, 103-118.

4. Dmitriev, D.A., Massino, Yu.S., and Segal, O.L. (2003) Kinetic analysis of interactions between bispecific monoclonal antibodies and immobilized antigens using a resonant mirror biosensor. *Journal of Immunological Methods*, 280, 183-202.

5. Дмитриев, Д.А., Массино, Ю.С., Смирнова, М.Б., Сегал, О.Л., Павлова, Е.В., Коляскина, Г.И., Осипов, А.П., Егоров, А.М., и Дмитриев, А.Д. (2001) Связывание биспецифических моноклональных антител с антигенами, адсорбированными на твердой фазе. *Биоорганическая химия*, 27, 265-274.

6. Дмитриев, Д.А., Массино, Ю.С., Сегал, О.Л., Смирнова, М.Б., Павлова, Е.В., Коляскина, Г.И., Гуревич, К.Г., Гнеденко, О.В., Иванов, Ю.Д., Арчаков, А.И., Осипов, А.П., Дмитриев, А.Д., и Егоров, А.М. (2002) Анализ связывания биспецифических моноклональных антител с иммобилизованными антигенами с помощью оптического биосенсора. Биохимия, 67, 1643-1654.
