



СВЯЗЫВАНИЕ БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ С АНТИГЕНАМИ, АДСОРБИРОВАННЫМИ НА ТВЕРДОЙ ФАЗЕ

© 2001 г. Д. А. Дмитриев, Ю. С. Массино*, М. Б. Смирнова*, О. Л. Сегал*, Е. В. Павлова**,
Г. И. Коляскина**, А. П. Осипов, А. М. Егоров, А. Д. Дмитриев**#

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва;

* Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
117865, Москва, ул. Бутлерова, 5а;

** Научный центр психического здоровья РАМН, Москва

Поступила в редакцию 20.11.2000 г. Принята к печати 16.02.2001 г.

В работе изучена способность биспецифических антител (БИАТ), образованных путем слияния гибридом, и родительских моноклональных антител (МКА) взаимодействовать с антигенами, адсорбированными на твердой фазе. Использовались МКА, специфичные к трем различным антигенам: пероксидазе хрена (HRP), IgG человека (hIgG) и миоглобину человека (Mb), а также произведенные из них БИАТ со специфичностью: антимиоглобин/антипероксидаза (анти-Mb/HRP) и анти-IgG человека/антипероксидаза (анти-hIgG/HRP). Радиоиммунологическим и иммуноферментным методами показано, что с антигенами, адсорбированными на твердой фазе, связывается существенно больше родительских МКА, чем БИАТ. Наблюданная равновесная константа ассоциации (K_a) антипероксидазных родительских МКА с адсорбированной на твердой фазе HRP в 21 и 38 раз превышает K_a сайтов связывания с пероксидазой БИАТ (анти-Mb/HRP и анти-hIgG/HRP, соответственно). Расчитано, что около 90–95% всех связанных родительских антипероксидазных МКА ассоциированы с адсорбированной HRP бивалентно, и только 5–10% моновалентно. В противоположность этому, родительские МКА против hIgG связываются с адсорбированным антигеном практически только моновалентно. Продемонстрировано также, что avidность БИАТ со специфичностью антимиоглобин/антипероксидаза значительно увеличивается при одновременной сорбции на твердой фазе двух антигенов: Mb и HRP. Полученные данные позволяют утверждать, что БИАТ, несущие сайт связывания с ферментом (например, HRP), в гетерогенных неконкурентных иммунологических методах не могут быть более эффективны, чем традиционные конъюгаты (т.е. антитела, конъюгированные с ферментом).

Ключевые слова: твердофазный ИФА; бивалентное взаимодействие; аффинность; avidность; биспецифические антитела.

ВВЕДЕНИЕ

При использовании моноклональных антител (МКА) в иммуногистохимии, иммуноблотинге, твердофазном ИФА и других тестах, предполагающих связывание МКА с антигеном на твердой фазе, необходима количественная оценка этого связывания. Для характеристики процесса связывания МКА особое значение имеют две величины: истинная аффинность, характеризующая степень сродства отдельно взятого антигена связывающего сайта антитела к данному эпигенотипу антигена, и avidность, или общая эффективность связывания антитела с антигеном. Показано, в частности, что

avidность может значительно возрастать за счет бивалентного связывания антител с иммобилизованным антигеном [1].

Для практического применения МКА avidность имеет гораздо большее значение, чем истинная аффинность. В частности, это свойство следует иметь в виду при конструировании и практическом использовании так называемых биспецифических антител (БИАТ). Эти антитела получают как биологическим способом – путем слияния двух разных гибридом (при этом образуется так называемая тетрадома), так и с помощью химических или генно-инженерных методов [2, 3]. Отличительная черта БИАТ – это наличие мест связывания двух разных антигенов. БИАТ, у которых одно плечо связывается с ферментом (например, пероксидазой хрена), часто используются в иммунохимических методах вместо традиционных конъюгатов [4, 5]. С другой стороны, БИАТ

Сокращения: Ab – антитело; Ag – антиген; БИАТ – биспецифические антитела; МКА – моноклональные антитела; РИА – радиоиммунологический анализ; hIgG – IgG человека; HRP – пероксидаза хрена; Mb – миоглобин человека.

Автор для переписки (тел.: (095) 140-76-20; факс: (095) 952-89-40; e-mail: dmitrievda@mail.ru).

ния, в координатах $[B]$ от $[Ab]_0$. При низких значениях $[B]$ (следовательно $[Ag]_0 \gg [B]$) уравнение (1) может быть преобразовано:

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

Координаты $[B]$ от $[Ab]_0$ часто используют в твердофазном ИФА, при этом концентрацию связанных антител ($[B]$) представляют не в стандартных концентрационных единицах молярности, как это обычно делается, а в пропорциональных им оптических единицах. При этом величина тангенса угла наклона кривой связывания пропорциональна коэффициенту $K_a [Ag]_0 / (1 + K_a [Ag]_0)$.

1.2. Модель бивалентного связывания антител с антигеном, иммобилизованным на твердой фазе. В реальности, на поверхности твердой фазы может существовать смесь бивалентно и моновалентно связанных молекул МКА (рис. 1). В этом случае твердофазные методы оценивают avidность МКА при данных условиях эксперимента, а не истинную аффинность отдельно взятого антигена связывающего сайта антитела к данному антигенному эпигенотипу.

Процесс моновалентного связывания характеризуется равновесной константой ассоциации (K_1) (M^{-1}):

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

где k_1 – кинетическая константа ассоциации антигена связывающего сайта антитела с антигеном ($M^{-1} s^{-1}$); k_{-1} – кинетическая константа диссоциации моновалентного комплекса (s^{-1}); $[Ag]_s$ – концентрация свободных антигенов на поверхности (s – индекс, обозначающий поверхностную концентрацию (моль/ cm^2), а отсутствие индекса означает концентрацию в растворе (M)); $[AbAg]_s$ – концентрация моновалентного комплекса антитело-антigen. Процесс превращения моновалентного комплекса в бивалентный характеризуется равновесной константой ассоциации (K_2) (m^2/M):

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

где k_2 – кинетическая константа превращения моновалентного комплекса в бивалентный ($m^2 M^{-1} s^{-1}$); k_{-2} – кинетическая константа диссоциации бивалентного комплекса до моновалентного (s^{-1}); $[AbAg_2]_s$ – концентрация бивалентного комплекса антитело-антigen.

Статистический фактор 2 возникает из-за того, что на первой стадии IgG может связываться с антигеном любым своим плечом, в то время как диссоциировать только одним; на второй стадии верно обратное утверждение. Для БИАТ вторая

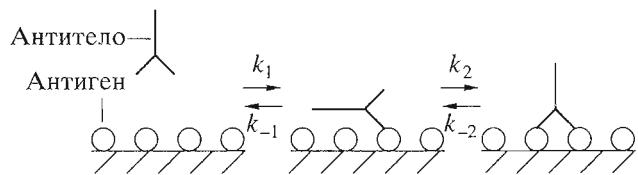


Рис. 1. Схема бивалентного связывания антител с иммобилизованным антигеном.

стадия процесса, представленного на рис. 1, невозможна и статистический фактор равен единице, так как к данному антигену у БИАТ есть только один сайт связывания.

Теперь совместим модель бивалентного связывания (уравнения (4) и (5)) с моделью уравнения (1), в которой взаимодействие антитело-антigen рассматривается как равновесный, одноступенчатый процесс с однородной валентностью связывания. Тогда выражение для наблюдаемой равновесной константы ассоциации (K_a) будет иметь следующий вид:

$$K_a = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[AbAg_2]_s + [AbAg]_s}{[Ab][Ag]_s} = K_1 (2 + K_2 [Ag]_s), \quad (M^{-1}) \quad (6)$$

где k_a – наблюдаемая кинетическая константа ассоциации ($M^{-1} s^{-1}$); k_d – наблюдаемая кинетическая константа диссоциации (s^{-1}).

Значение истинной равновесной константы ассоциации (K_1) в твердофазных методах можно измерить с помощью моновалентных БИАТ (или их аналогов – Fab-фрагментов). На основании сравнения параметров кривых связывания и графиков Скэтчарда, полученных с бивалентными МКА и моновалентными БИАТ, можно, как будет показано ниже, обнаружить наличие бивалентного связывания родительских МКА с иммобилизованным антигеном и количественно оценить долю бивалентно и моновалентно связанных молекул МКА.

1.3. Бивалентная модель для предсказания наблюдаемой равновесной константы ассоциации (K_a) в координатах Скэтчарда. Оценка K_a может быть проведена по величине тангенса угла наклона кривой при представлении данных в координатах Скэтчарда (уравнение (2)). При этом связанные с антигеном на твердой фазе антитела (B) следует представлять не в единицах поверхностной концентрации (моль/ cm^2), а в объемных концентрационных единицах (M), считая, что это та концентрация, которая получилась бы, если количество связанных антител находятся в том объеме, в котором находилось общее количество антител (Ab_0), добавляемых к антигену на поверхности твердой фазы.

Таблица 1. Характеристика использованных моноклональных антител

Клеточная линия	Изотип антител	Специфичность антител
Гибридомы		
14D6	IgG1	Анти-Mb
75G5	IgG1	Анти-hIgG
36F9	IgG1	Анти-HRP
Тетрадомы		
14D6 × 36F9	IgG1/IgG1	Анти-Mb/HRP
36F9 × 75G5	IgG1/IgG1	Анти-hIgG/HRP

Сайты связывания с соответствующим антигеном были идентичны у родительских моноклональных и биспецифических моноклональных антител.

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

1.4. Бивалентная модель для предсказания параметров кривых связывания антител с иммобилизованным антигеном. В координатах уравнения (3) ([B] от [Ab]₀), коэффициент (тангенс угла наклона) кривой связывания равен $K_a[Ag]_0/(1 + K_a[Ag]_0)$. При отсутствии бивалентного связывания наблюдаемая равновесная константа ассоциации (K_a) для родительских МКА, равная $2K_1$, будет в два раза превышать K_a для БИАТ, равную K_1 . Коэффициент кривой связывания родительских МКА будет равен $2K_1[Ag]_0/(1 + 2K_1[Ag]_0)$, а коэффициент кривой 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 кривых 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 кривых связывания родительских МКА и БИАТ превышает 2, то это свидетельствует о наличии бивалентного связывания МКА с иммобилизованным антигеном.

1.5. Соотношение бивалентно и моновалентно связанных антител. При наличии бивалентного связывания родительских МКА с иммобилизованным антигеном из уравнения (5) можно вы-

числить соотношение бивалентно и моновалентно связанных антител:

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

Величину $K_2[Ag]_s$ в литературе принято называть “усиливающим фактором” (“enhancement factor”) [16]. Как можно видеть из уравнения (7), эта величина равна удвоенному соотношению бивалентно и моновалентно связанных антител. Соотношение бивалентно и моновалентно связанных антител можно вычислить из уравнения (6), зная значение K_a для БИАТ, равное K_1 , и значение K_a для родительских МКА.

1.6. Бивалентная модель для предсказания наблюдаемых кинетических параметров связывания антител с иммобилизованным антигеном. Вышеприведенные уравнения позволяют также сравнить кинетические параметры связывания родительских МКА и БИАТ. Наблюдаемая кинетическая константа ассоциации (k_a) для БИАТ равна k_1 из уравнения (4). Для родительских МКА величина k_a в большинстве случаев не зависит от наличия или отсутствия бивалентного связывания [15] и равна $2k_1$. Наблюдаемая кинетическая константа диссоциации (k_d) для БИАТ равна k_{-1} . Значение k_d для родительских антител выводится из уравнения (6):

$$k_d = \frac{k_{-1}}{K_2[Ag]_s/2 + 1}. \quad (8)$$

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.

2. Характеристика родительских МКА и БИАТ

В исследовании использовали ранее полученные нами гибридомные и тетрадомные клеточные линии [9, 19]. Изотип и специфичность продуцируемых клеточными линиями антител приведены в табл. 1. Анализировалась панель аффинно очищенных антител в отношении трех антигенов, отличавшихся по молекулярной массе и структуре: миоглобин — $M_r \approx 17800$, пероксидаза хрина — $M_r \approx 40000$ и IgG человека — $M_r \approx 160000$. БИАТ производились тетрадомами, которые были получены в результате слияния гибридом к Mb или hIgG с гибридом к HRP. Антитела всех трех родительских гибридом принадлежали к подклассу IgG1 мыши. Таким образом, БИАТ не только несли места связывания антигенов, идентичные родительским МКА [9], но и имели такую же структуру константной части как у родительских МКА.

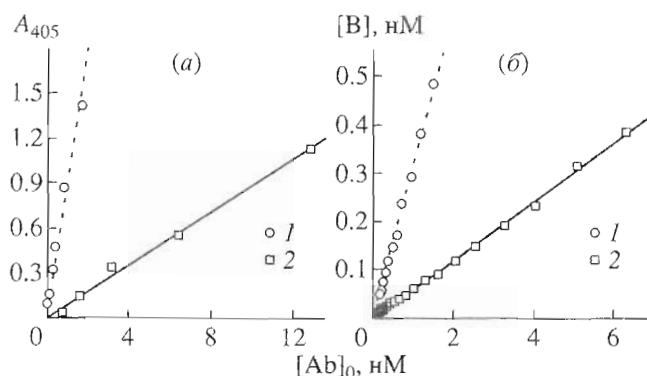


Рис. 2. Связывание с адсорбированным миоглобином родительских и биспецифических моноклональных антител: анти-Mb, клон 14D6 (1); анти-Mb/HRP, клон 14D6 × 36F9 (2). Приведены данные твердофазного ИФА (а) и данные РИА (б).

В настоящей работе связывание антител с иммобилизованными антигенами изучалось радиоиммунологическим (РИА) и твердофазным иммуноферментным (ИФА) методами.

3. Изучение связывания родительских МКА и БИАТ с адсорбированными на твердой фазе антигенами иммуноферментным методом

Анализируемая панель включала антипeroxидазные МКА и БИАТ, которые несли сайт связывания с HRP (табл. 1). Для регистрации связывания использовали меченные биотином антимышьи антитела и avidin, конъюгированный со щелочной фосфатазой. Поскольку все анализируемые антитела относились к подклассу IgG1 мыши, можно полагать, что все антитела настоящей панели одинаково воспринимались выбранной антиавидиновой системой тестирования.

Полученные иммуноферментным методом кривые связывания родительских МКА и БИАТ с антигенами, адсорбированными на твердой фазе, представлены на рис. 2а, 3а и 4а. Кроме того, в табл. 2 приводятся величины тангенсов угла наклона (коэффициентов) кривых связывания. По соотношению величин этих коэффициентов (табл. 2) можно видеть, что с Mb связывается в 10 раз больше родительских МКА, чем БИАТ (рис. 2а). Существенная разница в связывании родительских МКА и БИАТ наблюдается и для адсорбиро-

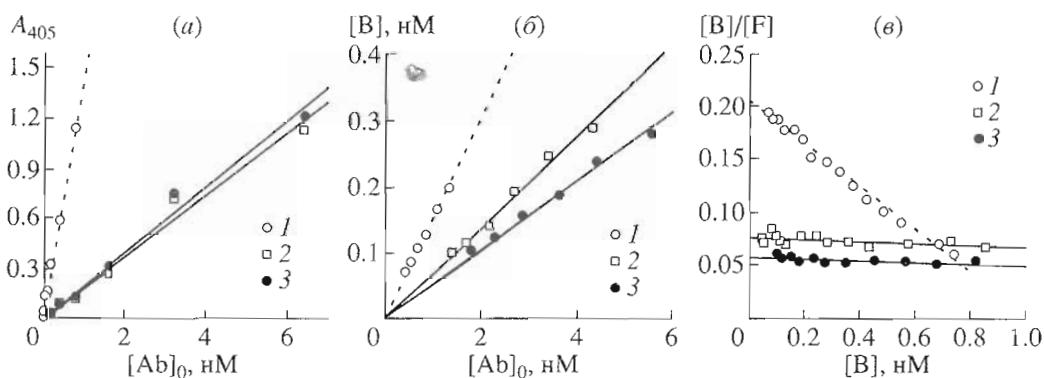


Рис. 3. Связывание с адсорбированной пероксидазой родительских и биспецифических моноклональных антител: анти-HRP, клон 36F9 (1); анти-Mb/HRP, клон 14D6 × 36F9 (2); анти-hIgG/HRP, клон 36F9 × 75G5 (3). Приведены данные твердофазного ИФА (а), данные РИА (б) и данные РИА в координатах Скэтчарда (в).

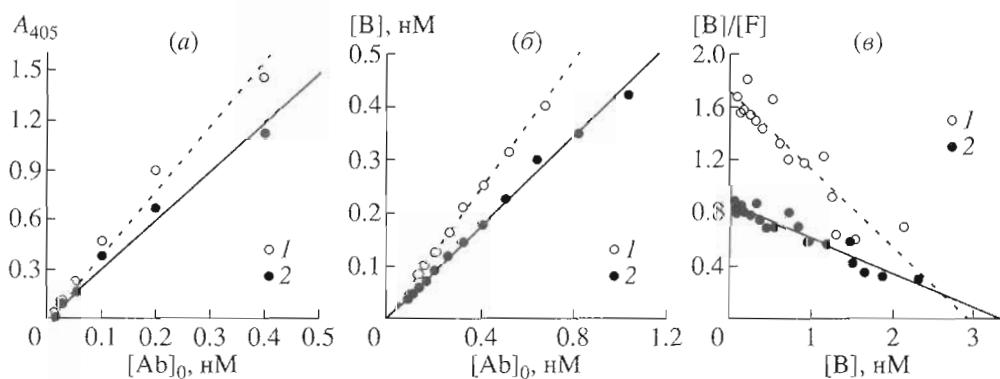


Рис. 4. Связывание с адсорбированным hIgG родительских и биспецифических моноклональных антител: анти-hIgG, клон 75G5 (1); анти-hIgG/HRP, клон 36F9 × 75G5 (2). Приведены данные твердофазного ИФА (а), данные РИА (б) и данные РИА в координатах Скэтчарда (в).

Таблица 2. Тангенсы угла наклона (коэффициенты) кривых связывания родительских моноклональных и биспецифических моноклональных антител с антигеном, адсорбированным на твердой фазе

Метод	Специфичность антител	Антиген на твердой фазе	Номер рисунка	Коэффициент кривой связывания
ИФА	Анти-Mb	Mb	2a	$(9.5 \pm 0.6) \times 10^{-4}$
	Анти-Mb/HRP	Mb	2a	$(9.0 \pm 1.0) \times 10^{-5}$
	Анти-HRP	HRP	3a	$(1.5 \pm 0.1) \times 10^{-3}$
	Анти-Mb/HRP	HRP	3a	$(1.9 \pm 0.1) \times 10^{-4}$
	Анти-hIgG/HRP	HRP	3a	$(2.0 \pm 0.1) \times 10^{-4}$
	Анти-hIgG	hIgG1	4a	$(3.8 \pm 0.2) \times 10^{-3}$
	Анти-hIgG/HRP	hIgG1	4a	$(2.9 \pm 0.1) \times 10^{-3}$
	Анти-Mb	Mb	2б	$(3.2 \pm 0.1) \times 10^{-1}$
	Анти-Mb/HRP	Mb	2б	$(6.0 \pm 0.1) \times 10^{-2}$
	Анти-HRP	HRP	3б	$(1.5 \pm 0.1) \times 10^{-1}$
РИА	Анти-Mb/HRP	HRP	3б	$(6.8 \pm 0.1) \times 10^{-2}$
	Анти-hIgG/HRP	HRP	3б	$(5.2 \pm 0.1) \times 10^{-2}$
	Анти-hIgG	hIgG1	4б	$(6.0 \pm 0.1) \times 10^{-1}$
	Анти-hIgG/HRP	hIgG1	4б	$(4.3 \pm 0.1) \times 10^{-1}$

ванной пероксидазы: с HRP связывается в 7.5 раз больше родительских МКА, чем БИАТ (рис. 3а, табл. 2). БИАТ, полученные от разных клонов, но несущие одинаковый сайт связывания с HRP (специфичность анти-Mb/HRP и анти-hIgG/HRP) связываются с пероксидазой практически идентично (рис. 3а). На основании теоретических представлений о соотношении коэффициентов кривых связывания (см. раздел 1.4) 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. 4а, табл. 2). В этом случае соотношение коэффициентов кривых связывания МКА и БИАТ составляет всего лишь 1.3. Как показано в теоретическом разделе 1.4, это может свидетель-

ствовать об отсутствии бивалентного связывания родительских МКА с иммобилизованным hIgG1.

Кроме того, для БИАТ анти-Mb/HRP было исследовано связывание при одновременной адсорбции на твердой фазе смеси двух антигенов: HRP и Mb (молярное соотношение адсорбируемых антигенов в насыщающем растворе 1 : 1). Величина коэффициентов кривых связывания показывает, что с двумя антигенами, адсорбированными на твердой фазе, связывается в 2.8 раза больше БИАТ, чем при индивидуальной адсорбции HRP, и в 6.6 раз больше антител, чем при индивидуальной адсорбции Mb (рис. 5). Таким образом, с двумя антигенами (HRP и Mb), одновременно адсорбированными на твердой фазе, БИАТ связываются гораздо эффективнее, чем с HRP или Mb, адсорбированными индивидуально. Это может свидетельствовать о том, что часть молекул БИАТ связалась бивалентно: соответствующие сайты связались одновременно с двумя адсорбированными антигенами (рис. 6). Наши данные стоят в одном ряду с более ранними наблюдениями об усилении лизиса клеток и avidности связывания при использовании БИАТ, способных связываться одновременно с двумя различными антигенами клеточной поверхности [20].

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

Для экспериментов использовали БИАТ и МКА, меченные ^{125}I . Данные по связыванию представляли в виде кривых в координатах: концентрация связанных антител от концентрации общих антител (аналог кривых связывания в твердофазном ИФА) или в координатах Скэтчарда. Аффинная очистка меченых антител позволи-

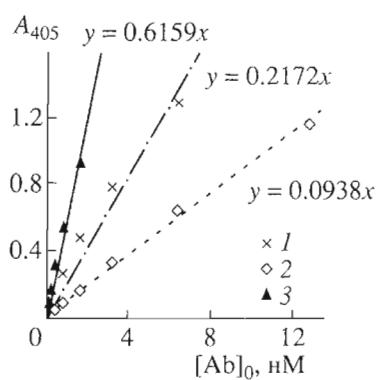


Рис. 5. Связывание биспецифических моноклональных антител со специфичностью анти-Mb/HRP (клон 14D6 × 36F9) с адсорбированными антигенами: пероксидазой (1), миоглобином (2) и их смесью в молярном соотношении 1 : 1 (3). Определение в твердофазном ИФА.

ла получить фракцию антител, в которой вся радиоактивность ^{125}I представлена иммунологически активными антителами. Это весьма существенно для йодированных белков, так как после йодирования хлораминовым методом некоторая часть молекул антител может терять антигенсвязывающую активность [21]. После аффинной очистки концентрацию иммунологически активных антител определяли твердофазным ИФА.

Кривые связывания, представленные на рис. 2б и 3б, показывают, что существенная разница в связывании с Mb и HRP между родительскими МКА и БИАТ имеет место и при тестировании связывания радиоиммунологическим методом. По величине коэффициентов кривых связывания (табл. 2) можно рассчитать, что с Mb на твердой фазе связывается в 5.3 раза больше родительских МКА, чем БИАТ анти-Mb/HRP (рис. 2б). С иммобилизованной HRP родительских антипероксидазных МКА связывается в 2.2 раза больше, чем БИАТ анти-Mb/HRP, и в 2.9 раза больше, чем БИАТ анти-hIgG/HRP (рис. 3б). Соотношение коэффициентов кривых связывания родительских МКА и БИАТ (табл. 2) в случае иммобилизованных Mb и HRP больше двух, что позволяет сделать выводы о наличии бивалентного связывания МКА с пероксидазой и миоглобином (раздел 1.4). Для иммобилизованного hIgG1 (рис. 4б) отношение коэффициентов кривых связывания родительских МКА и БИАТ (табл. 2) 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.

Способность МКА бивалентно связываться с иммобилизованным антигеном во многом зависит от стерического взаимодействия антигенсвязывающего сайта МКА с соответствующим эпитопом антигена [1]. 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 цепочечную структуру, что также может сказываться на характере связывания. В работе [15] 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.

Следует отметить, что при представлении кривых связывания в координатах уравнения (3) в твердофазном ИФА различие в связывании между

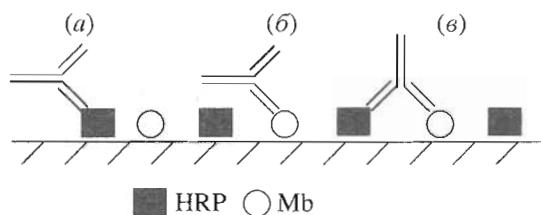


Рис. 6. Схема моновалентного (а, б) и бивалентного (в) связывания биспецифических моноклональных антител со специфичностью анти-Mb/HRP с антигенами (пероксидазой и миоглобином), адсорбированными на твердой фазе.

родительскими МКА и БИАТ для иммобилизованных Mb и HRP больше, чем в РИА (рис. 2 и 3, табл. 2). Для того чтобы объяснить это явление, следует учесть, что ИФА (в нашем случае) включает в себя три последовательные инкубации: с родительскими МКА или БИАТ, с антимышьями антиантителами, меченными биотином, и с avidinом, конъюгированным со щелочной фосфатазой. А в РИА имеет место всего одна инкубация: с меченными 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 1.6). 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 кривых 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 1.6). Этот вывод подтверждается при сравнении связывания между родительскими МКА и БИАТ с иммобилизованным hIgG1 (табл. 2, рис. 4а и 4б).

Для определения наблюдаемой равновесной константы ассоциации (K_a) данные, полученные с помощью РИА, были представлены в координатах Скэтчарда (рис. 3в и 4в). Метод Скэтчарда позволяет определить K_a по тангенсу угла наклона кривой связывания (табл. 3). Как можно видеть из табл. 3, K_a родительских антипероксидазных антител в 38 раз превышает K_a антипероксидазного сайта БИАТ с двойной специфичностью к HRP и hIgG и в 21 раз превышает K_a антипероксидазного сайта БИАТ, специфичных к HRP и Mb (рис. 3в). Следует обратить внимание, что K_a антипероксидазного сайта БИАТ, специфичных к HRP и Mb, в 1.8 раз превышает K_a антипероксидазного сайта БИАТ со специфичностью к HRP и hIgG, что лежит в пределах погрешности определения K_a твердофазным радиоиммунологическим методом [12–16]. Зная соотношение констант, из

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

Клеточная линия	Специфичность антител	Антиген на твердой фазе	K_a, M^{-1}
36F9	Анти-HRP	HRP	$(2.0 \pm 0.1) \times 10^8$
14D6 × 36F9	Анти-Mb/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	$(2.6 \pm 0.2) \times 10^8$

уравнений (6) и (7) (разделы 1.2 и 1.5) для родительских МКА можно рассчитать соотношение бивалентно и моновалентно связанных антител $[AbAg_2]/[AbAg]$. Это соотношение составляет 9 и 18, в зависимости от того, значение K_a каких БИАТ (анти-Mb/HRP или анти-hIgG/HRP) считать истинной аффинностью антипероксидного 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. 4e), K_a родительских МКА в 2,3 раза выше, чем K_a анти-hIgG-сайта БИАТ (табл. 3). Соотношение K_a МКА и БИАТ в данном случае подтверждает вывод, сделанный на основе сравнения кривых связывания, об отсутствии бивалентного связывания родительских МКА с иммобилизованным hIgG1. Действительно, теоретически, при отсутствии бивалентного связывания K_a для родительских МКА должна быть в 2 раза больше, чем K_a для БИАТ (раздел 1.3). Различие между теоретической и экспериментальной величинами K_a лежит в пределах погрешности определения наблюдаемой равновесной константы ассоциации РИА.

В отношении иммобилизованного миоглобина данные не приводятся, так как корректных кривых Скэтчарда для антимиоглобиновых МКА и миоглобинсвязывающего сайта БИАТ получить не удалось в трех независимых экспериментах.

В ряде работ БИАТ, включающие сайт связывания с ферментом, рассматриваются как эффективные меченные антитела (конъюгаты) [4–7]. Так, одними из первых были описаны антитела со специфичностью антисоматостатин/анти-HRP [10]. Утверждалось, что они не менее эффективны в иммуногистохимии при тестировании соматостатинпродуцирующих клеток, чем МКА к соматостатину. Наши данные наглядно свидетельствуют, что в неконкурентных тестах, основанных на связывании антител с антигенами, адсорбированными на твердой фазе, БИАТ не дают и не могут дать выигрыша в чувствительности в сравнении с теми родительскими МКА, которые могут связываться с адсорбированным антигеном бивалентно, поскольку БИАТ не способны связываться бивалентно. По существу, о том же свидетельст-

вуют более ранние данные по связыванию Fab-фрагментов и целых молекул IgG с антигенами, адсорбированными на твердой фазе или антигенами клеточной поверхности [1, 12–16]. В нашей недавней работе мы сравнили эффективность традиционного конъюгата с эффективностью БИАТ в сэндвич-методе определения миоглобина [19]. Показано, что в неконкурентном твердофазном ИФА БИАТ значительно уступают традиционному конъюгату как в чувствительности анализа, так и в его разрешении.

В последнее время большое внимание уделяется исследованиям по получению так называемых одноцепочечных фрагментов антител (с помощью генно-инженерных методов) [22, 23], в том числе и эффективных бивалентных фрагментов [3]. Однако пока эту возможность в полной мере реализовать не удалось: несмотря на бивалентность, тетрацепочечные биспецифические фрагменты связывались с антигенами намного хуже исходных МКА, вариабельная область которых была воспроизведена в одноцепочечных молекулах [3]. Тем не менее дальнейшие исследования по созданию поливалентных генно-инженерных антител являются перспективным путем для увеличения авидности БИАТ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Очистка миоглобина. Миоглобин выделяли из сердечных мышц человека по ранее описанной методике [24]. В исследовании использовался белок с чистотой более 95% [25].

Очистка антител. МКА клонов 14D6, 36F9 и 75G5 очищали с помощью аффинной хроматографии на антиген-сефарозе из асцитов, полученных после инокуляции мышей соответствующими гибридомными клетками. Приготовление аффинных носителей, процедура аффинной хроматографии и буферные системы детально описаны ранее [26]. БИАТ анти-Mb/HRP (клон 14D6 × 36F9) очищали путем двух последовательных аффинных хроматографий: на HRP-сефарозе и Mb-сефарозе. БИАТ анти-hIgG/HRP (клон 36F9 × 75G5) – путем последовательных хроматографий на HRP-сефарозе и hIgG-сефарозе. Чистоту антител проверяли с помощью SDS-электрофореза в 12.5% полиакриламидном геле [27]. В отдельных экспериментах показано, что аффинно очищенные ан-

титела сохраняют свою иммунологическую активность, так как при повторной аффинной хроматографии более 99% антигенсвязывающей активности антител вновь связывалось с аффинным носителем (данные не приводятся).

Определение концентрации белка. Концентрацию очищенного раствора миоглобина, очищенных антител и пероксидазы хрена определяли оптическим методом. При концентрации Mb 10 мг/мл $A_{280} = 17.6$ и $A_{220} = 13.2$ [28]. При концентрации очищенных антител 10 мг/мл $A_{280} = 14.0$ [28]. Для 1% раствора очищенной HRP $A_{403} = 22.75$ и $A_{280} = 7.3$ [29].

Определение антигенсвязывающей активности антител после аффинной очистки. Антигенсвязывающую активность антител (анти-Mb, клон 14D6 и анти-hIgG, клон 75G5) определяли твердофазным ИФА как описано ранее [26]. Активность антипероксидазных антител (клон 36F9), а также БИАТ, несущих сайт связывания с HRP (анти-Mb/HRP, клон 14D6 × 36F9 и анти-hIgG/HRP, клон 36F9 × 75G5) определяли следующим образом. Иммунные планшеты (Госниимедполимер, Россия) насыщали HRP (Calbiochem, $R_z > 3.0$) в течение ночи при комнатной температуре (10 мкг/мл в 0.05 М карбонатном буфере, pH 9.5; 100 мкл раствора на лунку). Готовили разведения антител в концентрациях: 1 – 4096 нг/мл. Антитела растворяли в 0.025 М Na-фосфатном буфере pH 7.4 с 0.15 М NaCl, 0.5 г/л твином-20 и 2 г/л BSA (ELI-буфер). После четырех–пяти отмывок дистиллированной водой планшеты последовательно инкубировали при 37°C с разведениями антител (3 ч, 100 мкл на лунку), антимышиными овечьими антителами, меченными биотином (Sigma, 0.7 мкг/мл в ELI-буфере, 100 мкл на лунку, 1 ч) и avidinом, конъюгированным со щелочной фосфатазой (Sigma, 0.5 мкг/мл в ELI-буфере, 100 мкл на лунку, 1 ч). Цветную реакцию проводили с гексагидратом *n*-нитрофенилфосфата натрия (PNPP). PNPP (1 мг/мл) растворяли в 97 г/л диэтаноламиновом буфере с 100 мг/л MgCl₂ · 6H₂O, pH 9.8. Инкубацию (100 мкл на лунку) продолжали 30 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 2 М NaOH (50 мкл на лунку). Поглощение регистрировали на плашечном ридере при 405 нм. В дополнение к этому активность БИАТ определяли с помощью биспецифического ИФА, как описано ранее [2, 26], и подтвердили способность БИАТ одновременно связывать два антигена.

Анализ связывания антител с адсорбированными на твердой фазе антигенами иммуноферментным методом. Иммунные планшеты насыщали HRP, hIgG1 (препарат был любезно предоставлен Т.Н. Баталовой, Институт эпидемиологии им. Табричевского, Москва), Mb (10 мкг/мл в 0.05 М Na-карбонатном буфере pH 9.5; 100 мкл на лунку) или смесью HRP и Mb в молярном соотношении 1:1 (3.2 мкг/мл миоглобина и 5.8 мкг/мл HRP в том же буфере, 100 мкл на лунку) в течение ночи

при комнатной температуре. Готовили разведения родительских МКА и БИАТ в концентрациях: 1–4096 нг/мл. Планшеты, насыщенные антигеном, последовательно инкубировали с антителами (все пробы в четырех повторах), антимышиными антителами, меченными биотином и avidinом, конъюгированным со щелочной фосфатазой (детали описаны в разделе 4).

Йодирование антител и их очистка. Антитела йодировали хлораминовым методом [21]. Для йодирования 10 мкг антител использовали 20 МБк ¹²⁵I (Изотоп, Россия). Меченные антитела аффинно очищали на соответствующих антиген-сефарозных носителях как описано ранее [26] с некоторыми модификациями. Антитела элюировали 0.1 М уксусной кислотой pH 2.2 с 0.2% BSA (pH доводили концентрированной HCl). Элюаты нейтрализовали раствором концентрированного аммиака. ¹²⁵I-меченные БИАТ (анти-hIgG/HRP) очищали путем последовательных аффинных хроматографий на HRP-сефарозе и hIgG-сефарозе. БИАТ анти-Mb/HRP очищали путем последовательных аффинных хроматографий на HRP-сефарозе и Mb-сефарозе. Меченные антитела хранили при 5°C и использовали в реакциях связывания с антигеном в течение одной недели.

Определение концентрации ¹²⁵I-мечеными антителами после аффинной очистки. Концентрацию меченых антител определяли как описано выше. Для определения концентрации БИАТ анти-hIgG/HRP анализировали их связывание с HRP и hIgG и рассчитывали среднюю концентрацию. Для определения концентрации БИАТ анти-Mb/HRP анализировали их связывание с HRP и Mb и рассчитывали среднюю концентрацию.

Анализ связывания ¹²⁵I-мечеными антителами с антигеном, адсорбированным на твердой фазе. Гибкие иммунные планшеты (Titertek) насыщали антигеном, как описано выше (50 мкл на лунку), и инкубировали 3 ч при 37°C с растворенными в ELI-буфере ¹²⁵I-мечеными антителами (1×10^3 – 1×10^7 имп/мин/мл, 50 мкл раствора на лунку). Двукратное увеличение времени инкубации не приводило к достоверному увеличению регистрируемого связывания (данные не приводятся). Планшеты 4–5 раз сполоскивали дистиллированной водой, высушивали ночь при комнатной температуре, вырезали лунки и просчитывали на γ -счетчике GammaTrac 1191. Для определения общего количества ¹²⁵I-меченых антител из каждого разведения просчитывалась аликвота объемом 50 мкл.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kaufman E.N., Jain R.K. // Cancer Res. 1992. V. 52. P. 4157–4167.
- Massino Y.S., Kizim E.A., Dergunova N.N., Vostrikov V.M., Dmitriev A.D. // Immunol Lett. 1992. V. 33. P. 217–222.

3. Coloma M.J., Morrison S.L. // Nature Biotechnology. 1997. V. 15. P. 159–163.
4. Fanger M.W., Morganelli P.M., Guyre P.M. // Crit. Rev. Immunol. 1992. V. 12. P. 101–124.
5. Cao Y., Suresh M.R. // Bioconjug. Chem. 1998. V. 9. P. 635–644.
6. Fanger M.W., Guyre P.M. // Trends Biotechnol. 1991. V. 9. P. 375–380.
7. Self C.H., Cook D.B. // Curr. Opin. Biotechnol. 1996. V. 7. P. 60–65.
8. Allard W.J., Moran C.A., Nagel E., Collins G., Largen M.T. // Mol. Immunol. 1992. V. 29. P. 1219–1227.
9. Smirnova M.B., Dergunova N.N., Kizim E.A., Massino Yu.S., Nikulina V.A., Segal O.L., Tereshkina E.B., Kolyaskina G.I., Dmitriev A.D. // Biochemistry (Moscow). 1997. V. 62. P. 41–48.
10. Milstein C., Cuello A.C. // Nature. 1983. V. 305. P. 537–540.
11. Somasundaram C., Matzku S., Schuhmaker J., Zoller M. // Cancer. Immunol. Immunother. 1993. V. 36. P. 337–345.
12. Crothers D.M., Metzger H. // Immunochemistry. 1972. V. 9. P. 341–357.
13. Mason D.W., Williams A.F. // Handbook of Experimental Immunology / Ed. D.M. Weir. 4th ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1980. P. 38.1.
14. Ways J.P., Parham P. // Biochem. J. 1983. V. 216. P. 423–432.
15. Dower S.K., Ozato K., Segal D.M. // J. Immunol. 1984. V. 132. P. 751–758.
16. Dower S.K., DeLisi C., Titus J.A., Segal D.M. // Biochemistry. 1981. V. 20. P. 6326–6340.
17. McCloskey N., Turner M.W., Goldblatt D. // J. Immunol. Meth. 1997. V. 205. P. 67–72.
18. Djavadi-Ohaniance L., Friquet B. // The Immunochemistry of Solid-phase Immunoassay / Ed. J.E. Butler. CRC Press: Boca Raton FL, 1991. Chapter 10.
19. Smirnova M.B., Nikulina V.A., Segal O.L., Kizim E.A., Massino Y.S., Ryazanskaya N.N., Kolyaskina G.I., Dmitriev A.D. // Biochemistry (Moscow). 1999. V. 6. P. 639–647.
20. Wong J., Colvin R.V. // J. Immunol. 1987. V. 139. P. 1369–1374.
21. Чард Т. Радиоиммунологические методы. Пер. с англ. М.: Мир, 1981.
22. Pluckthun A., Pack P. // Immunotechnology. 1997. V. 3. P. 83–105.
23. Hudson P.J. // Curr. Opin. Immunol. 1999. V. 11. P. 548–557.
24. Strausser H.R., Rothfeld E.L., Bucsi R.A. // Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.). 1966. V. 122. P. 661.
25. Nikulina V.A., Kizim E.A., Massino Y.S., Segal O.L., Smirnova M.B., Avilov V.A., Saprin D.B., Smotrov S.P., Tichenko V.A., Kolyaskina G.I., Dmitriev A.D. // Clin. Chim. Acta. 2000. V. 299. P. 25–44.
26. Massino Y.S., Dergunova N.N., Kizim E.A., Smirnova M.B., Tereshkina E.B., Kolyaskina G.I., Dmitriev A.D. // J. Immunol. Methods. 1997. V. 201. P. 57–66.
27. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 277. P. 680–685.
28. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology / Ed. G.O. Faseau. 3rd ed. L.: CRC Press, 1976. V. II. P. 383.
29. Ishikawa E., Imagawa M., Hashida S., Yoshitake S., Hamaguchi Y., Ueno T. // J. Immunoassay. 1983. V. 4. P. 209.

The Binding of Bispecific Monoclonal Antibodies to the Solid Phase-Adsorbed Antigens

D. A. Dmitriev*, Yu. S. Massino, M. B. Smirnova**, O. L. Segal**, E. V. Pavlova***,
G. I. Kolyaskina***, A. P. Osipov*, A. M. Egorov*, and A. D. Dmitriev****

e-mail: dmitrievda@mail.ru

*Moscow State University, Chemical Faculty, Vorob'evy gory, GSP-3 Moscow, 119899 Russia

**Institute of High Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences,
ul. Butlerova 5a, Moscow, 117865 Russia

***Center of Mental Health, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

The ability of bispecific antibodies (Babs) formed by fusion of hybridomas and parent monoclonal antibodies (Mabs) to interact with the solid phase-adsorbed antigens was studied. Mabs specific to the three different antigens [horseradish peroxidase (HRP), human IgG (hIgG), and human myoglobin (Mb)] as well as Babs with the double specificity [antimyoglobin/antiperoxidase (anti-Mb/HRP) and anti-hIgG/antiperoxidase (anti-hIgG/HRP)] were used. It was shown by radioimmunological and immunoenzyme assays that parent Mabs bind to solid phase-adsorbed antigens considerably more effectively than Babs. The observed equilibrium binding constant (K_a) of antiperoxidase parental Mabs to immobilized HRP is 21 and 38 times higher than K_a for Babs binding sites (anti-Mb/HRP and anti-hIgG/HRP, respectively) to peroxidase. It was calculated that about 90–95% of all bound parental antiperoxidase Mabs were associated with immobilized HRP bivalently, and only about 5–10% were bound monovalently. On the contrary, parental Mabs against hIgG bind to the sorbed antigen essentially only monovalently. It was also shown that the avidity of anti-Mb/HRP Babs significantly increased when two antigens, Mb and HRP, were simultaneously adsorbed on the solid phase. These data imply that Babs bearing an enzyme-binding site (for example, binding to HRP) cannot be more effective than standard conjugates (e.g., enzyme-conjugated antibodies) in heterogeneous noncompetitive immunoassays. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: affinity, avidity, bispecific antibodies, bivalent interaction, ELISA