

М.О. Водяник, В.П. Чернишов, М.Є. Гуменюк

Функціональні властивості коопераційних моноклональних антитіл проти фактора некрозу пухлин людини

Изучались функциональные свойства кооперативных моноклональных антител, совместное применение которых повышает эффективность связывания молекул антигена. На примере 23 полученных моноклональных антител против фактора некроза опухолей (ФНО) человека показано, что генерация кооперативных антител имеет селективное преимущество и большинство из анти-ФНО моноклональных антител принадлежат по специфичности к двум кооперативным эпитопам А1 и С1. По функциональным свойствам кооперативные моноклональные антитела представляют два типа нейтрализующих антител. С1 моноклональные антитела являются нейтрализующими антителами конкурентного типа, блокирующий эффект которых проявляется вследствие прямого экранирования рецепторсвязывающего участка ФНО. А1 моноклональные антитела являются нейтрализующими антителами аллостерического типа, которые блокируют активность ФНО путем изменения его биологически активной конформации. Совместное применение А1 и С1 моноклональных антител обеспечивает синергичную нейтрализацию ФНО посредством комбинированного сочетания конкурентной и аллостерической нейтрализации. Кооперативность антител может отражать их естественную адаптацию к наиболее эффективной нейтрализации белковых антигенов.

Вступ

Кооперативність є природною властивістю антитіл, які входять до складу поліклональних антисироваток, і проявляється в синергічному підсиленні зв'язування антигенів антитілами різної епітопної специфічності. Цю властивість антитіл вперше було встановлено при вивченні ефективності зв'язування антигенів змішаними препаратами моноклональних антитіл, коли виявилось, що зв'язування антигена першими антитілами може призводити до посилення його зв'язування іншими антитілами більше ніж в 100 разів [4]. Механізм цього явища полягає в просторовій або конформаційній адаптації антитіл. Просторовий коопераційний ефект проявляється при розпінанні коопераційними антитілами різних епітопів антигена у такій орієнтації, при якій можливе утворення циклічних комплексів, що містять дві молекули антигена і дві молекули антитіл [10,11]. Посилення зв'язування в цьому випадку відбувається за рахунок додаткового внеску авідності [10]. Конформаційна кооперація антитіл пов'язана з індукцією структурних змін молекули антигена при його взаємодії з першими антитілами і появою нових епітопів для високоафінного зв'язування других антитіл [7,12]. Особливістю конформаційної адаптації є чіткий поділ коопераційних антитіл на

© М.О. Водяник, В.П. Чернишов, М.Є. Гуменюк

первинні й вторинні за їх здатністю індукувати або проявляти коопераційне зв'язування відповідно. Не зважаючи на вивчені механізми коопераційності антитіл, залишається відкритим питання про їх функціональне значення, а саме, який вплив справляють коопераційні антитіла на прояв біологічної активності антигенів. У зв'язку з цим метою нашого дослідження було отримання коопераційних моноклональних антитіл проти фактора некрозу пухлин (ФНП) людини з подальшою оцінкою їх здатності викликати нейтралізацію біологічної активності ФНП.

Методика

Рекомбінантний ФНП людини (чистота >95%; питома активність $4 \cdot 10^7$ од/мг) був отриманий від Fermentas MBI (Вільнюс, Литва). Всі біохімічні реагенти були отримані від фірми "Sigma Chemical Co.", США. Клітинні лінії мишиної міеломи Sp2/0 і фібросаркоми L929 отримані з інституту цитології РАН (Санкт-Петербург, Росія). Клітини міеломи Sp2/0 та гібридами культивувалися на повному середовищі IMDM з 10% ембріональної телячої сироватки (ЕСТ; Bio-Mark Inc., Львів). Клітини L929 культивувалися на повному середовищі RPMI-1640 з 5% ЕСТ.

Миші BALB/c (8-10 тижні) були імунізовані ФНП за типовою для розчинних антигенів схемою [3] у варіантах підшкірної або внутрішньочеревної ін'єкції ФНП на повному ад'юванті Фрейнда. Титри анти-ФНП антитіл у сироватці визначали непрямим імуноферментним аналізом (ІФА). Спленоцити мишей з титром $>1/32000$ зливалися 50%-м розчином поліетиленгліколю з міелою Sp2/0. Отримання гібридом проводили за методом Köhler і Milstein [8] з урахуванням деяких модифікацій [3,6]. Гібридами нарощувалися в асцитній формі у сенсibilізованих пристаном BALB/c мишей. Препарати моноклональних антитіл отримували з асцитної рідини методом послідовної преципітації каприловою кислотою та сульфатом амонію [9] з наступною афінною очисткою на протеїн-А сефарозі (фірма "Pharmacia", Швеція). Біологічну активність ФНП оцінювали за цитотоксичною дією на клітини L929 у тесті з кристалічним фіолетовим [1]. Нейтралізуючу активність моноклональних антитіл визначали кількісно в значеннях молярного надлишку антитіл до ФНП для 100% нейтралізації або в нейтралізуючих одиницях на 1 мг білка. Ізотипи Ig і IgG субкласи визначали непрямим ІФА [6]. Афінність моноклональних антитіл визначали неконкурентним ІФА [2]. Картування епітопів, рецепторзв'язуючої ділянки (РЗД) ФНП і виявлення коопераційних антитіл виконували методом зворотного конкурентного аналізу [5] за допомогою кон'югату ФНП-європій. Для мічення ФНП використовували комерційний набір реагентів "Europium-labelling kit" фірми "Wallac Oy", Фінляндія. Вимірювання флуоресценції хелатів європійю проводили на флуориметрі з часовим розподіленням ARCUS 1230 фірми "Wallac Oy", Фінляндія.

Для статистичного аналізу використовували критерій t Стьюдента і кореляційний аналіз Пірсона. Аналіз виконували за допомогою комп'ютерної програми SPSS for Windows (SPSS Inc., США).

Результати та їх обговорення

Для підвищення ймовірності отримання різноепітопних моноклональних антитіл використовувалися два типи імунізації мишей BALB/с препаратом ФНП: внутрішньочеревна і підшкірна. Відповідно до титрів анти-ФНП антитіл у сироватці, ефективність підшкірної імунізації була в середньому в 2,3 раза вищою, ніж при внутрішньочеревній імунізації, що відповідало кількості отриманих гібридом від цих імунізацій – 16 і 7 відповідно.

Епітопний аналіз 23-х отриманих анти-ФНП моноклональних антитіл показав, що їх специфічність розподілена в межах 3-х епітопних регіонів (ЕР) ФНП, позначених як А, В і С. Кожен ЕР включає 2-3 епітопи, один із яких є найбільш імуногенним або домінуючим (А1, В1 і С1) згідно з більшим числом антитіл, які його представляють. Решта епітопів (А2, А3, В2, В3, С2) менш імуногенні і представлені окремими антитілами. Всі моноклональні антитіла, які були отримані за допомогою внутрішньочеревної імунізації, відрізнялися моноспецифічністю до С1 епітопу, тоді як антитіла від підшкірної імунізації мали специфічність проти всіх епітопів, але з більшістю А1 і В1 антитіл (табл. 1).

Таблиця 1. Імунохімічні та функціональні характеристики анти-ФНП моноклональних антитіл.

Клон	Імунізація*	Ізотип Ig	Епітоп	Коопераційні антитіла**	Константа афінності ($\times 10^8$ моль ⁻¹)	Нейтралізуючі одиниці ($\times 10^4$ / мг Ат)
Епітопний регіон А						
1А6	п/ш	А	А1	С1 ($\times 2.5$)	102.1	303.1
5А5	п/ш	G2b	А1	С1 ($\times 5.5$)	35.3	7.6
5Е12	п/ш	G1	А2	В1 ($\times 2.5$)	2.6	-
3В1	п/ш	G1	А1	С1 ($\times 1.8$)	2.3	-
2Н5	п/ш	G1	А1	С1 ($\times 2.3$)	2.1	-
2В3	п/ш	G1	А3	-	2.0	-
Епітопний регіон В						
1G10	п/ш	G1	В1	А2 ($\times 1.6$)	131.2	54.9
5А12	п/ш	А	В2	-	20.4	33.1
3Е9	п/ш	G1	В1	А2 ($\times 2.3$)	5.2	-
7Н9	п/ш	G2b	В1	А2 ($\times 2.5$)	3.0	-
3А8	п/ш	G1	В3	-	0.6	-
Епітопний регіон С						
Е64	в/ч	G2a	С1	А1 ($\times 2.5$)	13.1	54.2
F74	в/ч	G1	С1	А1 ($\times 3.1$)	8.9	42.8
С83	в/ч	G2a	С1	А1 ($\times 4.4$)	3.7	16.7
F35	в/ч	G2b	С1	А1 ($\times 4.5$)	2.4	13.2
D12	в/ч	G2a	С1	А1 ($\times 4.7$)	1.9	7.7
3А10	п/ш	А	С2	-	1.5	-
8В1	п/ш	G2b	С1	А1 ($\times 4.8$)	0.7	-
Е18	в/ч	G1	С1	А1 ($\times 5.0$)	0.5	-
G77	в/ч	G1	С1	А1 ($\times 5.1$)	0.4	-
1С1	в/ш	G1	С2	А1 ($\times 5.5$)	0.4	-
1С2	п/ш	М	С1	-	-	-
4А3	п/ш	М	С1	-	-	-

Примітка. (*) – підшкірна (п/ш), внутрішньочеревна (в/ч); (**) – позначена епітопна специфічність коопераційних моноклональних Ат і максимальне підсилення зв'язування ФНП у варіанті кооперації (в дужках).

Ідентифікація 3-х головних епітопних регіонів ФНП, які містять домінуючий епітоп високої імуногенності і суміжні епітопи більш низької імуногенності, дозволяє передбачати спрямований характер генерації антитіл до цих ЕР з різним ступенем реалізації. Для цього може бути дві причини. По-перше, з приводу структурних обмежень, ФНП має лише три конформаційно-стійких ділянки, до яких можлива генерація високоафінних антитіл, і по-друге, з приводу функціональних обмежень, молекула ФНП містить три ділянки, у разі зв'язування яких досягається його нейтралізація, тобто саме ефект нейтралізації ФНП виступає фактором селекції епітопної специфічності анти-ФНП антитіл. При вивченні залежності нейтралізуючої активності моноклональних антитіл від їх афінності та епітопної специфічності було встановлено, що високоафінні антитіла (із $K_a > 10^9$ моль⁻¹) кожного ЕР є нейтралізуючими, причому у межах кожного ЕР нейтралізуюча активність окремих антитіл знижується при зниженні їх афінності саме до повної втрати ефекту нейтралізації при афінності нижче від певного рівня (див. табл. 1). На цій підставі правомірно стверджувати, що генерація анти-ФНП антитіл проти окремих ЕР визначається їх потенційною здатністю нейтралізувати біологічну активність ФНП, але внаслідок недостатньої афінності деяких антитіл, цей ефект проявляється не завжди.

Наявність нейтралізуючих анти-ФНП антитіл різної епітопної специфічності вказує на можливість існування різних механізмів нейтралізації ФНП. Типовим є конкурентний механізм, коли антитіла розпізнають епітопи, розташовані в межах РЗД і його екрануванням блокують зв'язування ФНП з ФНП-Р. Можливим є також алостеричний механізм, коли антитіла, зв'язуючи РЗД-незалежні епітопи, провокують конформаційні зміни РЗД і таким чином відмінюють взаємодію ФНП з ФНП-Р. Для визначення цих механізмів проводилося картування РЗД відносно епітопів нейтралізуючих моноклональних антитіл з використанням препаратів р55 і р75 розчинних ФНП-Р (рФНП-Р). Всі нейтралізуючі антитіла незалежно від епітопної специфічності повністю блокували зв'язування ФНП з рФНП-Р. Однак комплекси ФНП з рФНП-Р зв'язувалися ЕР-А і ЕР-В, але не ЕР-С антитілами (табл. 2). На цій підставі можна стверджувати, що ЕР-С розташований в межах РЗД, і нейтралізуючі ЕР-С антитіла блокують ФНП за допомогою конкурентного механізму, тоді як ЕР-А/В антитіла, у зв'язку з РЗД-незалежною локалізацією відповідних епітопів, нейтралізують ФНП алостерично. Різний характер нейтралізації ФНП у ЕР-С і ЕР-А/В антитіл також підтверджується наступними спостереженнями: нейтралізуюча активність ЕР-С антитіл з'являється при афінності близько 10^8 моль⁻¹, тоді як для нейтралізуючих ЕР-А/В антитіл необхідна афінність не менше ніж 10^9 моль⁻¹ (див. табл. 1); при збільшенні афінності ЕР-С антитіл, їх нейтралізуюча активність зростає прямо пропорційно ($r = 0,99$; $p < 0,001$), тоді як для ЕР-А/В антитіл ця залежність має непропорційний характер; не зважаючи на підвищені вимоги до афінності, тільки алостеричні ЕР-А антитіла досягають максимального рівня нейтралізації ФНП.

Виявлення коопераційних моноклональних антитіл проводилося на етапі епітопного картування. Критерієм кооперативності було підвищення зв'язування ФНП першими моноклональними антитілами при наявності

Таблиця 2. Картування рецепторзв'язуючої ділянки (РЗД) ФНП

Епітопний регіон	Моноклональні антитіла	Зв'язування ФНП при наявності рФНП-Р, %	
		р55 рФНП-Р	р75 рФНП-Р
EP-A	1A6*	61,0 ± 5,7	65,5 ± 3,8
	5N*	80,9 ± 4,3	66,0 ± 8,5
	5A5*	41,6 ± 4,1	53,2 ± 6,3
	5E12	56,2 ± 2,1	40,5 ± 8,1
	2H5	37,6 ± 5,8	34,9 ± 6,3
		(55,5 ± 17,2)	(52,0 ± 14,2)
EP-B	1G10*	80,8 ± 4,2	80,7 ± 6,3
	5A12*	33,0 ± 5,3	40,8 ± 4,9
	3E9	23,2 ± 3,2	48,4 ± 8,3
	7H9	19,3 ± 4,5	39,3 ± 7,8
		(39,0 ± 28,4)	(52,3 ± 19,3)
EP-C	E64*	7,8 ± 1,8	11,1 ± 3,6
	F74*	7,9 ± 1,4	11,3 ± 4,7
	C83*	7,3 ± 1,8	8,6 ± 2,4
	F35*	7,9 ± 1,8	8,0 ± 2,6
	D12*	7,8 ± 0,8	8,1 ± 1,6
	E18	4,7 ± 1,4	5,4 ± 1,9
	G77	3,1 ± 0,4	3,8 ± 1,2
		(6,6±1,9)	(8,0 ± 2,7)
РЗД	р55 рФНП-Р	5,9 ± 1,7	6,6 ± 1,9
	р75 рФНП-Р	6,1 ± 4,5	7,6 ± 3,5
		(6,0 ± 0,1)	(7,1 ± 0,7)

Примітка. Дані для кожного моноклонального антитіла представлені у вигляді залишкового процента (%) сорбції ФНП при наявності конкуруючих р55 і р75 рФНП-Р відносно значень контрольної сорбції (100%) без конкуруючих компонентів; у дужках вказано середнє значення по епітопній групі; (*) – нейтралізуючі антитіла.

других більше ніж в 1,5 раза (>150% контрольного зв'язування). Було встановлено, що моноклональні антитіла, спрямовані до А1 і С1 епітопів, мають взаємопідсилююче зв'язування ФНП і складають головну коопераційну пару. Ефект кооперації також відмічався між А2 і В1 антитілами, але через єдині антитіла середньої афінності, що представляють А2 епітоп (5Е12), цей варіант вважався неістотним (див. табл. 1). При аналізі коопераційних пар, які складались із окремих А1 і С1 антитіл, відмічалось їх розділення на первинні та вторинні залежно від здатності індукувати або проявляти підсилене зв'язування ФНП відповідно. У такому варіанті кооперації найбільш вірогідним є конформаційний механізм адаптації, коли зв'язування первинних антитіл індукує конформаційні зміни молекули ФНП, що призводять до більш вигідної експозиції епітопів вторинних антитіл [7,12]. Оскільки А1 і С1 антитіла представлені як первинними так і вторинними Ат, а також враховуючи максимальну імуногенність А1 і С1 епітопів, правомірно стверджувати, що по-перше, А1 і С1 епітопи є конформаційнозалежними, тобто зв'язування одного епітопа викликає конформаційні зміни у ділянці локалізації іншого, і по-друге, переважна генерація антитіл до цих епітопів відображає процес пріоритетної селекції коопераційних

антитіл, які забезпечують конформаційну деформацію ФНП. Виходячи із функціональних характеристик коопераційних антитіл, можна пояснити значення цього феномену. За належністю до ЕР-А і ЕР-С, коопераційні А1 і С1 антитіла представляють два типи нейтралізуючих антитіл: алостеричні і конкурентні. Тому їх кооперативність може мати значення для більш ефективної нейтралізації ФНП. Підтвердженням цього є синергічна нейтралізація ФНП, що спостерігалася лише у суміші А1 і С1 антитіл, але не будь-яких одноепітопних антитіл або р55 і р75 рФНП-Р (табл. 3).

Таблиця 3. Синергічна нейтралізація ФНП коопераційними А1 і С1 моноклональними антитілами

Компонент		Рівень нейтралізації ФНП, молярний надлишок			
		1 (n=6)	2 (n=6)	1 + 2 (50/50)	
1	2			адитивний	спостережуваний
РЗД р55	РЗД р75	221 ± 15	514 ± 26	367 ± 13	364 ± 23
С1 Е64	С1 F74	24,9 ± 3,1	32,7 ± 3,9	28,8 ± 3,1	28,6 ± 3,1
А1 5А5	А1 1А6	175 ± 26	4,4 ± 0,5	89,9 ± 12,7	91,2 ± 12,6
С1 Е64	А1 5А5	24,9 ± 3,1	175 ± 26	100,2 ± 13,3	52,2 ± 7,5*
С1 Е64	А1 1А6	24,9 ± 3,1	4,4 ± 0,5	14,6 ± 1,8	7,6 ± 1,1*

Примітка. Нейтралізуючий ефект суміші компонентів (стовбчик 1+2) в досліді (спостережуваний) порівнювався з розрахованим рівнем адитивного ефекту, виходячи із активності кожного компоненту окремо (стовбчики 1 і 2); (*) – $p < 0,001$.

Висновки

При використанні скринінг-тесту на коопераційне зв'язування ФНП було отримано і охарактеризовано коопераційні анти-ФНП моноклональні антитіла. Виявлено, що основну коопераційну пару складають нейтралізуючі антитіла алостеричного і конкурентного типу. Їх спільне використання забезпечує синергічну нейтралізацію ФНП комплементарним поєднанням алостеричної та конкурентної нейтралізації. На цій підставі вперше стверджується, що генерація коопераційних антитіл має спрямований характер для найбільш ефективної нейтралізації ФНП.

Автори висловлюють щире подяку професорові David Wallach (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel) за люб'язне надання препаратів р55 і р75 рФНП-Р.

M.A. Vodyanik, V.P. Chernyshov, M.E. Gumenyuk

FUNCTIONAL PROPERTIES OF COOPERATIVE MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST HUMAN TUMOR NECROSIS FACTOR

The panel of 23 newly produced monoclonal antibodies (mAbs) against human tumor necrosis factor (TNF) was examined for enhanced or cooperative TNF binding. Epitopic mapping revealed a preferential mAb generation against two epitopes designed as A1 and C1. Both A1 and C1 mAbs have neutralizing activity and display remarkable property to bind TNF synergistically comprising a pair of cooperative mAbs. C1 epitope resides within the TNF receptor-binding site (RBS) and responsible for generation of competitive neutralizing mAbs that block TNF activity by direct RBS masking. RBS-distal A1 epitope represents allosteric neutralizing mAbs that block TNF activity by conformational RBS changes. Combination of A1 and C1 mAbs resulted in synergistic TNF neutralization through complementary effect of competitive and allosteric TNF blocking mechanisms. Generation of cooperative Abs may have significance to achieve the most efficient neutralization of protein antigens with an intolerable functional activity *in vivo*.

Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Aggarwal B.B., Kohr W.J., Hass P.E., et al. Human tumor necrosis factor. Production, purification and characterization // J.Biol.Chem. – 1985. – **260**. – P.2345-2354.
2. Beatty D.J., Beatty B.G., Vlahos W.G. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay // J.Immunol.Meth. – 1987. – **100**. – P.173-179.
3. Campbell A.M. Monoclonal antibodies and immunosensor technology. – Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1991. – 425 p.
4. Ehrlich P.H., Moyle W.R. Cooperative immunoassays: Ultrasensitive assays with mixed antibodies // Science. – 1983. – **221**. – P.279-281.
5. Ehrlich P.H., Moyle W.R. Ultrasensitive cooperative immunoassays with mixed monoclonal antibodies // Meth.Enzymol. – 1986. – **121**. – P.695-702.
6. Goding J.W. Monoclonal antibodies: Principles and practice. – London: Academic Press Ltd., 1986. – 301 p.
7. Gomez K.A., Retegui L.A. Synergistic monoclonal antibodies interactions and their use for determination of antibody specificities // Mol. Immunol. – 1994. – **31**. – P.323-329.
8. Kuhler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // Nature. – 1975. – **256**. – P.495-497.
9. McKinney M.M., Parkinson A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid // J.Immunol.Meth. – 1987. – **96**. – P.271-278.
10. Moyle W.R., Anderson D.M., Ehrlich P.H. A circular antibody-antigen complex is responsible for increased affinity shown by mixtures of monoclonal antibodies to human chorionic gonadotropin // J.Immunol. – 1983. – **131**. – P.1990-1905.
11. Namazee D.A., Sato V.L. Enhancing antibodies: A novel component of the immune system // Proc.Natl.Acad.Sci.USA – 1982. – **79**. – P.3828-3832.
12. Weidner K.M., Voss E.W. Characterization of interactions involving anti-metatype antibodies and immune complexes // Mol.Immunol. – 1992. – **29**. – P.303-312.

Ін-т педіатрії, акушерства та гінекології АМН України, Київ

Матеріал надійшов до редакції 15.09.2000