



УДК 612.112.94.017.1-063

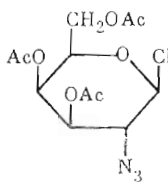
МОНОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К ИСКУССТВЕННОМУ Т-АНТИГЕНУ, ХАРАКТЕРИСТИКА ИХ СПЕЦИФИЧНОСТИ И ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ Т-АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ НА ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК*Медведев А. Э., Габриэлян Н. Д., Бовин Н. В., Хорлин А. Я.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Осуществлен синтез искусственного антигена Томсена-Фриденрейха Gal β 1-3GalNAc α 1-O(CH₂)₃NHCO(CH₂)₄-CO-BCA и с его помощью получены моноспецифические анти-Т-антитела. Подробно охарактеризована их специфичность. С помощью полученных антител идентифицированы углеводные цепи (Gal β 1-3GalNAc α 1-)Ser/Thr в асialogликопротеине, на поверхности десалирированных эритроцитов человека и кортикальных тимоцитов мышей.

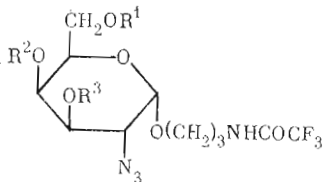
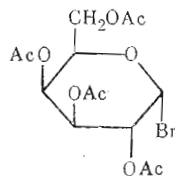
В настоящее время накоплено большое количество данных о наличии в составе мембран опухолевых клеток человека группоспецифических углеводных антигенов, отсутствующих в норме [1-4]. Примером могут служить антигены группы крови АВО, появляющиеся при опухолях желудочно-кишечного тракта [3], или антигены системы Льюиса, обнаруживаемые при опухолях поджелудочной железы [4]. Важным маркером опухолей человека является антиген Томсена-Фриденрейха (Т-антиген), обнаруживаемый у пациентов с карциномами молочной железы или легких [5, 6], а также при Т-лимфомах [7]. Иммунодоминантная группа Т-антигена представляет собой дисахаридный фрагмент Gal β 1-3GalNAc α 1 (T α), соединенный в гликопротеинах эритроцитов человека О-гликозидной связью с остатками серина или треонина [8]. T_N- и Т-антигены — предшественники М- и N-антигенов в биосинтетическом пути T_N→Т→N, M, в процессе которого происходит переход несалирированных структур (T_N и Т) в сиалогликопротеины (N и M) [9] (табл. 1). Известно, что дисахарид Gal β 1-3GalNAc является рецептором лектина арахиса *Arachis hypogaea* (PNA). Этот лектин распознает данную структуру в гликопротеинах и гликолипидах независимо от конфигурации галактозаминидной связи. Детерминанта для лектина арахиса входит в состав мембран кортикальных тимоцитов мышей и сиалируется в процессе их дифференцировки в иммунокомпетентные клетки [10].

Для изучения процессов дифференцировки и онкогенной трансформации необходимы чувствительные и высокоспецифические реагенты для детектирования углеводных антигенов на поверхности клеток. В качестве таковых перспективно применение моноспецифических антител, представляющих интерес как инструмент для исследования структуры и функции углеводных цепей гликоконъюгатов поверхности клетки. В задачу данной работы входило получение моноспецифических антител к синтетическому Т-антигену, характеристика их специфичности и применение для идентификации Т-антигенных детерминант на поверхности клеток.

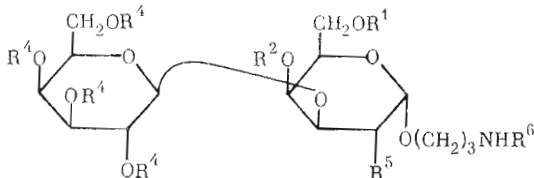
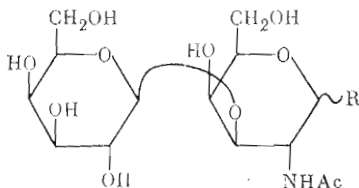
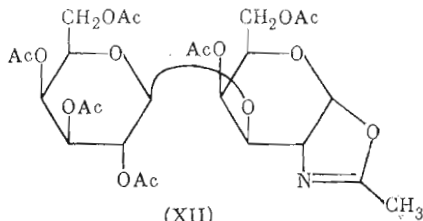
Синтез антигенов и ингибиторов. Синтез Т-антигена был осуществлен следующим образом. Гликозилирование 3-(трифторацетиламино)пропанола β -гликозилхлоридом (I) в условиях, описанных в работе [11], привело к α -гликозиду (II) (схема). Последний дезацетилировали, превращали в бензилиденное производное (III), которое гликозилировали по Гельферику ацетобромталактозой (IV). В дисахариде (V) защитные группы были удалены последовательным действием уксусной кислоты и метилата патрия. Соединение (VI) гидрировали, затем N-ацетилировали уксусным



(I)

(II) $R^1=R^2=R^3=Ac$ (III) $R^1R^2=PhCH<, R^3=H$ 

(IV)

(V) $R^1R^2=PhCH<, R^4=Ac, R^5=N_3, R^6=COCF_3$ (VI) $R^1=R^2=R^4=H, R^5=N_3, R^6=COCF_3$ (VII) $R^1=R^2=R^4=H, R^5=NHAc, R^6=COCF_3$ (VIII) $R^1=R^2=R^4=R^6=H, R^5=NHAc$ (IX) $R^1=R^2=R^4=H, R^5=NHAc, R^6=CO(CH_2)_4COOEt$ (T_{α} -sp-OEt)(X) $R^1=R^2=R^4=H, R^5=NHAc, R^6=CO(CH_2)_4CON_3$ (T_{α} -sp- N_3)(XI) $R = \beta-O(CH_2)_3NHCOCF_3$ (XIII) $R = OH$ (XIV) $R = \alpha-OBzl$ (T_{α} -OBzl)

(XII)

ангидридом; тем самым азидная группа была превращена в ацетамидную. В полученном таким образом гликозиде (VII) освобождали аминогруппу агликона («преспейсера») и далее амин (VIII) ацилировали N-оксисукцинимидным эфиром $SuNOOC(CH_2)_4COOEt$, как описано в работе [12]. Этиловый эфир (IX) превращали в азид (X), как это описано в работе [13]. Азид (X) конъюгировали с белками (бычьим сывороточным альбумином и цитохромом c) по методу [13]. Конъюгат с бычьим сывороточным альбумином (T_{α} -sp-BCA) содержал 10% углеводов (по весу), что соответствовало 20 цепям на молекулу синтезированного неогликопротеина, который в дальнейшем использовался для иммунизации. Конъюгат с цитохромом c (T_{α} -sp-ЦХС) содержал 14% углеводов, этот неогликопротеин использовался для изучения специфичности анти-T-антител. Конъюгат β -D-галактозы Gal β 1-3GalNAc β 1- с BCA (T_{β} -sp-BCA) получали из гликозида (XI) по схеме, идентичной описанной для α -аналога (VII). Гликозид (XI) синтезировали оксазолиновым методом из 3-(трифторацетило)-пропанола и оксазолина (XII) с последующим дезацетилизацией метилатом натрия; аналогичный синтез описан в работе [12].

Для изучения специфичности антител был также синтезирован $HO(CH_2)_3NHSO(CH_2)_4CO$ -BCA (BCA-sp-H): 3-аминопропанол ацилировали N-оксисукцинимидным эфиром моноэтилового эфира адипиновой кислоты, далее получали гидразид, азид и конъюгат с BCA, как описано выше.

В качестве ингибиторов реакции анти-T-антител с T_{α} -sp-BCA использовались соединения (XIII)–(XVI). Дисахарид (XIII), его α -бензилгликозид (XIV), а также α -бензил-N-ацетилгалактозаминид (XV) получены

Структура углеводных цепей антигенов и ингибиторов

Соединение	Структура
I. Антигены	
T _N	(GalNAcα1-)Ser/Thr
T	(Galβ1-3GalNAcα1-)Ser/Thr
N	$\begin{array}{c} \text{R} \qquad \qquad \text{R} \\ \qquad \qquad \\ \text{Leu-Ser-Thr-Thr-Gly-(Glu)} \\ \\ \text{R} \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{NeuAc} \\ 2 \\ \\ \alpha \\ 3 \\ \text{R-Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha 1- \end{array}$
M	$\begin{array}{c} \text{R} \qquad \qquad \text{R} \\ \qquad \qquad \\ \text{Ser-Ser-Thr-Thr-Gly-(Glu)} \\ \\ \text{R} \end{array}$ $\begin{array}{c} 6 \\ \\ \alpha \\ 2 \\ \text{NeuAc} \end{array}$

II. Ингибиторы

1. Ингибиторы, представляющие собой фрагменты искусственного T-антигена

β-Метилгалактозид (XVI)	Galβ1-OMe
α-Бензил-N-ацетилгалактозаминид (XV)	GalNAcα1-OBzl
Дисахарид (XIII)	Galβ1-3GalNAc
BCA-sp*-H	HO(CH ₂) ₃ NHCO(CH ₂) ₄ CO-BCA
T _α -sp-OEt (IX)	Galβ1-3GalNAcα1-O(CH ₂) ₃ NHCO(CH ₂) ₄ COOEt

2. Ингибиторы, в состав которых входит T-ганген, конъюгированный с другим типом спейсера или с другим агликоном

T _α -sp-ЦХС	Galβ1-3GalNAcα1-O(CH ₂) ₃ NHCO(CH ₂) ₄ CO-ЦХС
T _α -OBzl (XIV)	Galβ1-3GalNAcα1-OBzl

3. Природный гликопротеин, содержащий T-ганген

O-Цепи асиалофетулина	(Galβ1-3GalNAcα1-)Ser/Thr
-----------------------	---------------------------

* sp — спейсерная группа -O(CH₂)₃NHCO(CH₂)₄CO-

согласно работе [14]. β-Метилгалактопиранозид (XVI) использовался коммерческий (Reanal). Строение синтезированных сахаридов подтверждено при помощи спектров ¹H-ЯМР, все соединения имеют корректные элементные анализы. Подробному описанию синтеза и характеристике названных и некоторых близких по структуре соединений будет посвящена отдельная публикация.

Получение моноспецифических анти-T-антител. Получить углеводспецифические антитела на искусственные группоспецифические углеводные антигены достаточно трудно из-за слабой иммуногенности углеводных структур такого типа [15]. Для решения этой задачи необходимо изыскивать эффективные схемы иммунизации. Нами применялась схема иммунизации, описанная в работе [16], с небольшими модификациями. Для стимуляции клонов плазматических клеток к выработке антител за 3 сут до иммунизации кроликам подкожно вводили неочищенный экстракт вакцины *Bordetella pertussis* и затем иммунизировали T_α-sp-BCA с использованием полного адьюванта Фрейнда. После проведения трех иммунизаций в сыворотке иммунизированных кроликов появились антитела против BCA, и только после восьми иммунизаций в сыворотке обнаруживались углеводспецифические анти-T-антитела. Гипериммунную антисыворотку очищали от присутствовавших в ней антител на BCA, пропуская через колонку с иммуносорбентом сефароза-BCA, и затем выделяли моноспецифические антитела аффинной хроматографией на сефарозе-BCA-sp-T_α. На всех этапах выделения степень очистки антител контролировали с помощью метода иммунодиффузии по Ухтерлони [17], используя в качестве антигенов BCA-sp-H и T_α-sp-BCA.

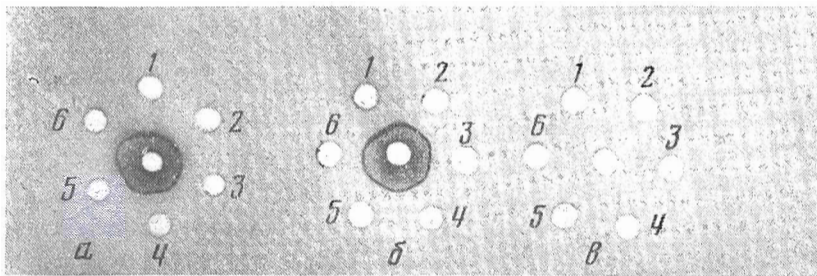


Рис. 1. Реакция иммунодиффузии по Ухтерлони исходной гипериммунной антисыворотки (560 мкг белка/лунка) (б) и моноспецифических анти-Т-антител (8 мкг/лунка) (а, в) с БСА-sp-H (б, в) и T_{α} -sp-BSA (а), используемых в качестве антигенов. Исходная концентрация антигенов 1 мг/мл. Объем пробы составляет 10 мкл/лунка. Центральные лунки — моноспецифические анти-Т-антитела (а, в) или исходная антисыворотка (б), периферические лунки (1-6) — серийные разведения антигенов в 0,15 М NaCl от 1:1 до 1:32

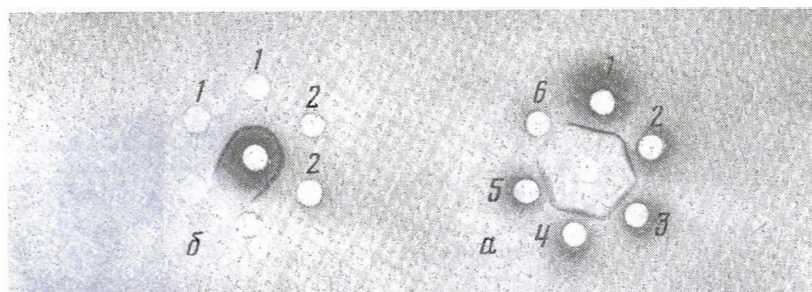


Рис. 2. Определение специфичности и титра моноспецифических анти-Т-антител с помощью метода иммунодиффузии по Ухтерлони. а — центральная лунка: T_{α} -sp-BSA (2,5 мкг/лунка), периферические лунки: серийные разведения моноспецифических анти-Т-антител от 1:1 до 1:32 в 0,15 М NaCl (исходная концентрация антител 0,8 мг/мл); б — центральная лунка: моноспецифические анти-Т-антитела (2 мкг/лунка), периферические лунки: 1) T_{α} -sp-BSA (2,5 мкг/лунка), 2) T_{α} sp-ЦХС (2,5 мкг/лунка)

Антитела, выделенные с помощью аффинной хроматографии, образовывали линию преципитации с T_{α} -sp-BSA (рис. 1а) и не реагировали с БСА-sp-H (рис. 1в), в то время как исходная антисыворотка содержала антитела также и на БСА (рис. 1б). Титр антител по отношению к иммунизирующему антигену (T_{α} -sp-BSA), определенный методом иммунодиффузии, равнялся 1:16 (рис. 2а).

Методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [18] была установлена кажущаяся молекулярная масса выделенных антител (150 кДа). Электрофоретические данные позволили также отнести выделенные антитела к классу IgG (локализация в геле легких и тяжелых цепей у полученных антител совпадала с таковой у нормальных кроличьих IgG).

Характеристика специфичности анти-Т-антител. С помощью качественной реакции преципитации антител с веществами, обладающими общей углеводной детерминантой, конъюгированной с различными белками-носителями (T_{α} -sp-BSA и T_{α} -sp-ЦХС), было установлено, что выделенные антитела являются углеводспецифическими (линии преципитации не образовывали полного или частичного перекреста) (рис. 2б). Этот же вывод подтвердился при характеристике антител методом иммуноферментного анализа (ИФА) [19], с помощью которого показано, что уровень связывания антител с T_{α} -sp-BSA и T_{α} -sp-ЦХС значительно превышает их уровень связывания с соответствующими белковыми носителями (БСА и ЦХС); последний практически совпадал с контрольным (рис. 3). Из рис. 3 следует, что уровни связывания антител с T_{α} -sp-BSA и с T_{α} -sp-ЦХС очень

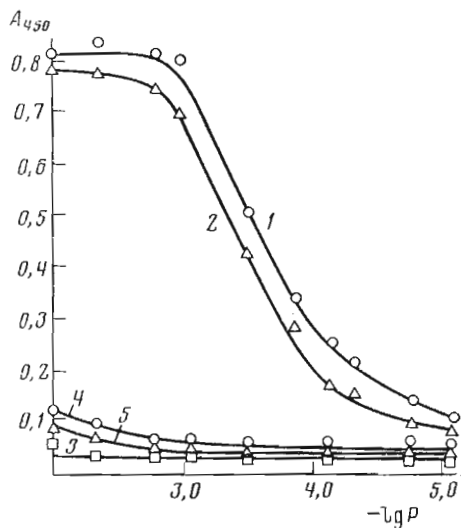


Рис. 3

Рис. 3. Анализ специфичности моноспецифических анти-Т-антител с помощью иммуноферментного метода. Р – разведение антител. Связывание антител с T_{α} -sp-БСА (1), T_{α} -sp-ЦХС (2), фетуином (3), БСА (4), ЦХС (5). Отложенные значения оптического поглощения соответствуют разнице значений в лунках, в которые в качестве контроля добавляли нормальный кроличий IgG

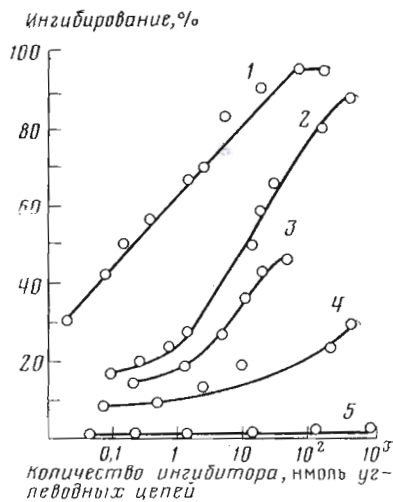


Рис. 4

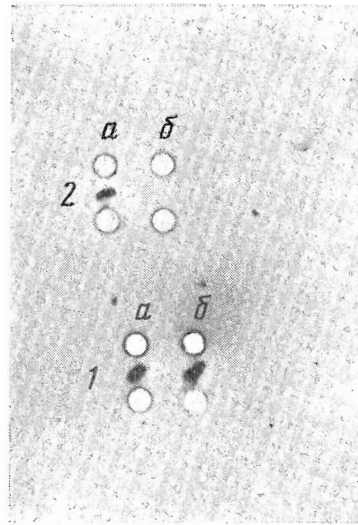
Рис. 4. Исследование методом ИФА ингибирования связывания моноспецифических анти-Т-антител с T_{α} sp-БСА-ингибиторами: T_{α} -sp-ЦХС (1), T_{α} -sp-OEt (2), асиалофетуином (3), T_{α} -OBzl (4), БСА-sp-H (5)

близки, что свидетельствует о высокой специфичности антител к фрагменту T_{α} -sp, поэтому в дальнейших опытах по ингибированию связывания антиген – антитело различными аналогами искусственного Т-антигена в качестве положительного контроля использовался T_{α} -sp-ЦХС. В качестве отрицательного контроля использовали нативный фетуин или БСА-sp-H. Титр антител, определенный с помощью ИФА, составлял 1 : 3200.

Для характеристики специфичности полученных антител необходимо было определить элементы структуры Т-антигена, существенные для связывания с антителами, а также оценить роль спейсера в этом процессе. С этой целью нами изучалось ингибирование связывания T_{α} -sp-БСА с анти-Т-антителами нижеперечисленными ингибиторами методом ИФА. Все исследованные ингибиторы можно подразделить на три группы (табл. 1): 1) ингибиторы, представляющие собой фрагменты искусственного Т-антигена: β -метилгалактозид (XVI), α -бензил-N-ацетилгалактозаминид (XV), дисахарид (XIII), T_{α} -sp-OEt (IX), БСА-sp-H; 2) ингибиторы, в состав которых входит Т-гаптен, конъюгированный с другим типом спейсера или с другим агликоном: T_{α} -sp-ЦХС, T_{α} -OBzl (XIV); 3) природный гликопротеин, несущий T_{α} -гаптенные группировки, – асиалофетуин.

В первой группе эффективным ингибитором оказался только T_{α} -sp-OEt, тогда как H-sp-БСА, дисахарид (XIII) и гликозиды (XV) и (XVI) не обнаружили ингибирующей активности (рис. 4). Отсюда следовало, что в состав антигенной детерминанты исследованного нами антигена (T_{α} -sp-БСА) входит как дисахаридное звено, так и часть структуры спейсера. Во второй группе активным ингибитором оказался T_{α} -sp-ЦХС, а T_{α} -OBzl показал меньшую, но отчетливую ингибирующую активность. Отсюда можно сделать вывод, что минимальной структурой, распознаваемой антителами, является фрагмент T_{α} -OCH₂, т. е. фрагмент природного Т-антигена. Это подтвердилось при исследовании асиалофетуина (третья группа). В состав молекул этого соединения входят три O-гликозидные цепи (Gal β 1-3GalNAc α 1-)Ser/Thr и три N-гликозидные цепи сложного типа, содержащие дисахаридную структуру Gal β 1-4GlcNAc, сильно отличающуюся

Рис. 5. Определение специфичности анти-Т-антител методом встречного иммуноэлектрофореза. 1 — реакция преципитации лектина арахиса с T_{α} -sp-BCA (а) и T_{β} -sp-BCA (б); 2 — реакция преципитации моноспецифических анти-Т-антител с T_{α} -sp-BCA (а) и T_{β} -sp-BCA (б)



щуюся по структуре от α -дисахаридных остатков Т-антигена [20]. С помощью ингибиторного анализа установлено, что асиалофетуин оказывает выраженный эффект ингибирования на связывание антител с T_{α} -sp-BCA (рис. 4).

Значительно большая эффективность T_{α} -sp-ЦХС в качестве ингибитора по сравнению с T_{α} -sp-ОЕт, вероятно, обусловлена иммобилизацией гаптенных группировок на полипептидной матрице. По-видимому, аналогичным образом можно объяснить и разницу в активностях асиалофетуина и T_{α} -ОВзI. Используемые нами в качестве ингибиторов T_{α} -sp-ЦХС, T_{α} -sp-ОЕт, асиалофетуин и T_{α} -ОВзI можно рассматривать как соединения, спейсеры которых различаются по своей структуре. Поскольку в указанном ряду соединений ингибиторная активность уменьшалась, нами был сделан вывод о влиянии модифицирования спейсерной структуры ингибитора на его эффект. Этот вывод хорошо согласуется с литературными данными [21].

Однако, несмотря на заметное влияние спейсера (или агликона) на связывание ингибиторов с активными центрами антител, дисахаридный остаток во всех случаях существенно необходим для проявления ингибиторной активности, причем, по-видимому, важна также и α -конфигурация галактозаминидной связи гаптена. Правильность последнего была подтверждена сравнительным изучением взаимодействия с антителами искусственных антигенов T_{α} -sp-BCA и Gal β 1-3GalNAc β 1-sp-BCA (T_{β} -sp-BCA), которые различались конфигурацией галактозаминидной связи гаптена.

Выше отмечалось, что дисахарид Gal β 1-3GalNAc α 1- характерен для гликопротеинов, в то время как аномерная структура Gal β 1-3GalNAc β 1- для гликопротеинов нетипична и входит в состав гликофинголипидов [22]. Методом встречного иммуноэлектрофореза [23] было показано, что зону преципитации с антителами образует T_{α} -sp-BCA, но не T_{β} -sp-BCA, в то время как с РНА взаимодействовали оба антигена (рис. 5).

Моноспецифические антитела, полученные к ганглиозиду асиало-GM $_1$, иммунодоминантной группой которого является Gal β 1-3GalNAc β 1-, реагировали с терминальным дисахаридом Gal β 1-3GalNAc α 1-, входящим в состав асиалогликофорина [24] и, следовательно, не различали конфигурацию гликозаминидной связи. Однако моноклональные антитела к природному Т-антигену практически не реагировали с β -связанным дисахаридом [19], что согласуется с нашими данными для моноспецифических анти-Т-антител. Таким образом, приведенная характеристика специфичности полученных нами антител позволяет считать их моноспецифическими антителами, которые способны с большой точностью узнавать Т-детерминанту (Gal β 1-3GalNAc α 1-) Ser/Thr гликопротеинов.

Агглютинация десалирированных эритроцитов человека
моноспецифическими анти-Т-антителами

Разведение антител	Количество антител на лунку, мкг	Степень агглютинации	
		НОЭ	Э
1 : 1	20	4+	0
1 : 2	10	4+	0
1 : 4	5	3+	0
1 : 8	2,5	2+	0
1 : 16	1,25	+	0
1 : 32	0,62	0	0

Примечание: НОЭ — эритроциты, обработанные нейраминидазой из холерного вибриона (Koch-Light, Англия); Э — нативные эритроциты.

Обнаружение иммунодетерминантной группы природного Т-антигена на поверхности клеток с помощью моноспецифических анти-Т-антител. Перспективы практического применения полученных нами антител во многом зависели от того, способны ли они реагировать с природным Т-антигеном на десалирированных эритроцитах человека [8]. Десалирирование эритроцитов проводили путем их обработки нейраминидазой холерного вибриона [19]. Используя этот метод, мы добились удаления 48% N-ацетилнейраминной кислоты с поверхности клеток, что хорошо согласуется с ранее опубликованными данными [19].

Взаимодействие десалирированных эритроцитов человека с полученными моноспецифическими анти-Т-антителами изучалось методом гемагглютинации [19]. Нами показано, что моноспецифические антитела агглютинировали десалирированные эритроциты и не реагировали с нативными эритроцитами (табл. 2). Выбранные в качестве контроля кроличьи IgG не реагировали ни с нативными, ни с десалирированными эритроцитами. Таким образом, полученные с помощью искусственного Т-антигена моноспецифические антитела реагировали и с природным антигеном Томсена-Фриденрейха.

Следующим этапом нашей работы было обнаружение Т-антигена на поверхности кортикальных тимоцитов мышей. В составе мембран этих клеток присутствуют детерминанты, распознаваемые PNA [10]. Выше упоминалось, что данный лектин реагирует как с иммунодоминантным дисахаридом Т-антигена, так и с соответствующим β-биозидом, входящим в состав гликосфинголипидов. Следовательно, на основании данных лектинного анализа невозможно было сделать однозначного вывода о том, распознаются ли на поверхности клеток оба эти типа гликоконъюгатов или какой-либо один из них. Для решения этой задачи нами применялись моноспецифические антитела. Популяции кортикальных тимоцитов получали, используя описанный ранее метод разделения клеток на кортикальные и медуллярные, основанный на их различиях в способности связываться с лектином арахиса [10]. Авторами цитируемой работы было установлено, что с лектином арахиса взаимодействуют преимущественно кортикальные тимоциты. Мы использовали процедуру фракционирования тимоцитов методом агглютинации-седиментации [10].

При добавлении лектина к популяции суммарных тимоцитов мышей линии СВА клетки распределялись на фракции: 1) неагглютинирующихся (7%), 2) частично агглютинирующихся (3%) и 3) полностью агглютинирующихся (кортикальных) тимоцитов (90%) (табл. 3). Клеточные фракции далее освобождали от лектина, инкубируя с галактозой, и использовали для дальнейших анализов. Содержание детерминант, узнаваемых лектином, в полученных фракциях клеток изучали методом флуоресцентного окрашивания тимоцитов флуоресцеинмеченым лектином арахиса [25]. Наибольшее содержание этих структур было обнаружено во фракции кортикальных тимоцитов (98%); в остальных фракциях клеток оно было

**Фракционирование суммарной популяции тимоцитов мышей
линии СВА методом агглютинации-седиментации с использованием
лектина арахиса (PNA)**

Фракция клеток	Количество клеток · 10 ⁸	Жизнеспособность, %	Выход, %	Степень флуоресценции, %
Суммарные тимоциты	7,73	97	—	87
PNA ⁻ -тимоциты	0,54	92	7	1
PNA [±] -тимоциты	0,23	91	3	3
PNA ⁺ -тимоциты	6,96	88	90	98

Примечание: PNA⁻, PNA[±], PNA⁺-тимоциты: неагглютинирующиеся, частично агглютинирующиеся и полностью агглютинирующиеся лектином арахиса (0,5 мг на пробу). Выход фракции рассчитывали по формуле

$$\text{выход} = (n_{\Phi} / n_{\Sigma}) \cdot 100,$$

где n_{Φ} — число клеток данной фракции, n_{Σ} — количество суммарных тимоцитов. Процент жизнеспособности определяли методом суправитальной окраски клеток трипановой синью (Serva, ФРГ). Степень флуоресценции оценивалась как количество флуоресцирующих клеток, приходящихся на 100 клеток [25].

Таблица 4

**Агглютинация кортикальных тимоцитов моноспецифическими
анти-T-антителами**

Фракция клеток	Количество клеток · 10 ⁸	Жизнеспособность, %	Выход, %
Кортикальные тимоциты	6,96	93	—
AT ⁻ -тимоциты	0,68	91	10
AT [±] -тимоциты	1,53	89	22
AT ⁺ -тимоциты	4,59	88	66

Примечание: AT⁻, AT[±] и AT⁺-тимоциты: неагглютинирующиеся, дающие частичную агглютинацию и полностью агглютинирующиеся антителами (0,5 мг на пробу). Выход фракций рассчитывали по формуле

$$\text{выход} = (n_{\Phi} / n_{\Sigma}) \cdot 100,$$

где n_{Φ} — число клеток данной фракции, n_{Σ} — количество кортикальных (агглютинирующихся PNA) тимоцитов.

Таблица 5

**Зависимость агглютинации кортикальных тимоцитов
от количества добавленных моноспецифических
анти-T-антител**

Количество добавленных анти-T-антител, мкг/пробу	Агглютинированные корти- кальные тимоциты, %
500	66
250	60
125	38
63	12
31	7

Примечание: процент агглютинированных клеток рассчитывали по формуле

$$(n_a / n_{\Sigma}) \cdot 100,$$

где n_a — число агглютинированных клеток, n_{Σ} — количество кортикальных тимоцитов.

минимальным (1–3%) (табл. 3). Полученные результаты позволяют считать использованную концентрацию лектина близкой к насыщающей.

Обработка суспензии кортикальных тимоцитов моноспецифическими анти-T-антителами приводила лишь к их частичной агглютинации, в то время как лектин арахиса полностью агглютинировал эти клетки и клетки, не агглютинирующиеся антителами (табл. 4). Добавление в контрольных пробах кроличьих Ig G не приводило к агглютинации. В специальном опыте было показано, что использованная концентрация антител была близка к насыщающей (табл. 5).

Частичность агглютинации может объясняться более узкой специфичностью полученных анти-Т-антител по сравнению с РНА в распознавании детерминант на поверхности клеток. В предыдущем разделе отмечалось, что моноспецифические антитела реагируют только с α -биозидными фрагментами. Поэтому полученные результаты позволяют предположить, что кортикальные тимоциты неоднородны по содержанию углеводных цепей гликопротеинов Gal β 1-3GalNAc α 1- и гликосфинголипидов Gal β 1-3GalNAc β 1-. Такая неоднородность, как и ее функциональная значимость, нуждается в специальных подробных исследованиях. Описанные здесь моноспецифические антитела могут служить эффективным инструментом в такого рода исследованиях.

Таким образом, нами получены моноспецифические антитела к синтетическому Т-антигену. Эти антитела специфически реагируют с природным Т-антигеном и могут применяться для изучения процессов дифференцировки и опухолевой трансформации, которые сопровождаются появлением углеводных антигенов на поверхности клеток.

Экспериментальная часть

Подробному описанию синтеза неогликопротеинов (Т α -sp-БСА, Т β -sp-БСА, Т α -sp-ЦХС) и ингибиторов будет посвящена отдельная публикация.

Иммунизация животных. В работе использовали беспородных кроликов. Была выбрана схема иммунизации [16] с небольшими модификациями. За 3 сут до иммунизации кроликам подкожно вводили неочищенный экстракт вакцины *Bordetella pertussis* по 0,5 мл на животное. Иммунизацию осуществляли путем подкожного введения конъюгата Т α -sp-БСА в четыре точки на спине по 600 мкг на животное с использованием полного адьюванта Фрейнда. Иммунный ответ контролировали через 7 сут после каждой иммунизации. Кроликов реиммунизировали через 21 сут после предыдущей иммунизации. Сыворотку получали следующим методом: кровь, взятую из ушной вены кролика, без применения гемостабилизаторов инкубировали при 37° С в течение 30 мин, оставляли на 12 ч при 4° С, после чего удаляли сгусток центрифугированием.

Получение моноспецифических анти-Т-антител. Иммуносорбенты сефарозу-БСА (2,2 мг БСА/мл сефарозы) и сефарозу-БСА-sp-Т α (2,5 мг конъюгата/мл сефарозы) получали по методу [26]. Гипериммунную антисыворотку очищали от присутствовавших в ней антител на БСА, пропуская ее через колонку с иммуносорбентом сефарозой-БСА, после чего выделяли моноспецифические антитела методом аффинной хроматографии [27] на сефарозе-БСА-sp-Т α . Класс антител определяли диск-электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в системе Лэммли [18], специфичность антител контролировали методом иммунодиффузии [17] и иммуноферментным методом [19].

Характеристика специфичности антител методом ИФА. Использовалась схема [19]. В лунки 96-луночных микроплет для ИФА (Dunatech, Швейцария) вносили растворы антигенов (10 мкг/лунка) в 0,01 М Na-фосфатном буфере, содержащем 0,5 М NaCl (рН 7,2, буфер А), и оставляли на 12 ч при 4° С. Между каждой операцией плейты трижды промывали буфером А, содержащим 0,05% твин-20 (буфер Б). Для уменьшения неспецифической сорбции в лунки вносили по 100 мкл раствора человеческого сывороточного альбумина в буфере А (100 мкг/мл) и инкубировали 2 ч при 37° С. После этого добавляли серийные разведения моноспецифических антител в буфере Б (контролем служили аналогичные разведения кроличьего IgG) и оставляли на 3 ч при 37° С и встряхивании. После отмывки добавляли по 50 мкл раствора ослиных антител против кроличьих IgG, конъюгированных с пероксидазой хрена (Serva, ФРГ) по методу [27], в разведении 1:800 в буфере Б и инкубировали 2 ч при встряхивании (37° С). Затем в лунки вносили по 50 мкл субстрата для пероксидазы хрена (перед употреблением смешивали водный раствор 5-аминосалициловой кислоты (0,8 мг/мл) с 15 мМ водным раствором H₂O₂ в соотношении 10:1, рН доводили до 6,0) и оставляли на 30 мин при 20° С. После этого

измеряли оптическое поглощение при 450 нм на спектрофотометре MR 600 Microplate Reader (Dynatech). Специфичность антител определяли, применяя метод ингибирования связывания антиген-антитело соответствующими ингибиторами сходной структуры. В лунки с сорбированным на них антигеном добавляли серийные разведения ингибиторов, после чего вносили антитела в разведении, дающем 50%-ное связывание. Степень ингибирования (%) рассчитывали по формуле

$$[A^1 - A^2/A^1] \cdot 100,$$

где A^1 и A^2 — поглощение при 450 нм в лунках без добавления и с добавлением ингибиторов.

Получение асиалофетуина. Десалирование фетуина (Sigma, США) проводили в течение 1 ч с помощью кислотного гидролиза в 0,1 н. H_2SO_4 при 80°С (концентрация гликопротеина 10 мг/мл). Гидролизат нейтрализовали аммиаком и диализовали против буфера А.

Ферментативное десалирование эритроцитов проводили по методу [19]. Эритроциты человека, выделенные из эритроцитарной массы и отмытые в буфере А, рН 7,2, ресуспендировали до 5%-ной суспензии в этом же буфере. В опытные пробы ($3 \cdot 10^8$ клеток) добавляли 100 ед. акт. нейраминидазы из холерного вибриона (Koch-Light, Англия) и инкубировали 60 мин при 37°С (в контрольных пробах фермент не добавляли). По окончании инкубации эритроциты трижды отмывали в буфере А, ресуспендировали до 1%-ной суспензии в буфере А, содержащем 5%-ную телячью эмбриональную сыворотку (Serva, ФРГ), и использовали для гемагглютинации. Сialовые кислоты определяли по методу Уоррена [28].

Реакцию гемагглютинации выполняли с использованием методики, взятой из работы [19]. В лунки 96-луночных планшетов для микротитрования (Linbro) вносили серийные разведения антител в буфере А, после чего добавляли по 50 мкл суспензии десалированных эритроцитов (в контроле добавляли нативные эритроциты) и оставляли на 2 ч при 4°С. По окончании инкубации результаты реакции учитывали визуально.

Суммарную фракцию тимоцитов мышей линии СВА получали по схеме из работы [10].

Фракционирование тимоцитов осуществляли методом агглютинации-седиментации с использованием лектина арахиса (Serva, ФРГ) [10]. Суммарную популяцию тимоцитов (10^8 клеток) инкубировали 30 мин с 0,5 мг РНА в 0,2 мл среды 199 при 20°С. По окончании инкубации клетки насливали на 20%-ную телячью эмбриональную сыворотку (Serva, ФРГ) в среде 199 и оставляли на 30 мин при 20°С. Образующиеся в результате седиментации верхнюю (неагглютинирующиеся тимоциты), среднюю (частично агглютинирующиеся) и нижнюю (полностью агглютинирующиеся лектином клетки) фракции переносили в пробирки и отделяли центрифугированием. К нижней фракции тимоцитов, дающих агглютинацию с РНА, добавляли 2 мл 0,3 М раствора галактозы в среде 199 и инкубировали 30 мин при 20°С и встряхивании. По окончании инкубации все клеточные фракции трижды отмывали средой 199 и определяли количество клеток и процент их жизнеспособности.

Агглютинация кортикальных тимоцитов моноспецифическими анти-Т-антителами. К суспензии кортикальных (агглютинирующиеся РНА) тимоцитов добавляли моноспецифические антитела (на 10^8 клеток 0,5 мг антител, в контрольных пробах добавляли аналогичное количество кроличьих IgG) и инкубировали 30 мин при 20°С. Клетки насливали на 20%-ную телячью эмбриональную сыворотку и оставляли на 30 мин при 20°С, после чего отбирали отдельно верхнюю (неагглютинирующиеся), среднюю (частично агглютинирующиеся) и нижнюю (полностью агглютинирующиеся антителами тимоциты) фракции. К нижней фракции клеток, дающей агглютинацию с антителами, добавляли 2 мл раствора T_α -sr-BCA в среде 199 (2 мг/мл) и инкубировали 30 мин при встряхивании (20°С). После окончания инкубации все фракции клеток отмывали в среде 199 и определяли количество клеток и процент их жизнеспособности. Зависимость степени агглютинации кортикальных тимоцитов от концент-

рации антител изучали, внося в пробирки с клетками (10^8 тимоцитов/пробу) серийные разведения антител. Дальнейший анализ проводили по вышеописанной схеме.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kabat E. A., Liao J., Shyong S., Osserman E. F. *J. Immunol.*, 1982, v. 128, № 2, p. 540-544.
2. Hakomori S. *Ann. Rev. Immunol.*, 1984, v. 2, № 2, p. 103-126.
3. Dabelstein E., Vedtofte P., Hakomori S., Young W. W., Jr. *Cancer Res.*, 1983, v. 43, № 3, p. 1451-1454.
4. Lemieux R. U., Baker D. A., Weinstein W. W., Switzer C. M. *Biochemistry*, 1981, v. 20, № 1, p. 199-205.
5. Springer G. F., Desai P. R., Banatwala I. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1975, v. 54, № 2, p. 335-339.
6. Springer G. F., Desai P. R., Fry W. A., Goodale R. L., Shearen J. G., Scanlon E. F. *Cancer Detect. Preven.*, 1983, v. 6, p. 111-118.
7. Springer G. F., Chingsong-Popov R., Schirrmacher V., Desai P. R., Tegtmeier H. *J. Biol. Chem.*, 1983, v. 258, № 9, p. 5702-5706.
8. Uhlenbruch G., Pardoe G. I., Bird G. W. G. *Z. Immun. Allg. Klin. Immunol.*, 1969, B. 138, H. 5, S. 423-433.
9. Springer G. F., Desai P. R. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1974, v. 61, № 2, p. 420-425.
10. Irle C., Piquet P.-F., Vassali P. *Cell Immunol.*, 1977, v. 31, № 242, p. 32-43.
11. Ferrari B., Pawia A. A. *Bioorganic Chemistry*, 1982, v. 11, № 1, p. 85-95.
12. Бовин Н. В., Иванова Н. А., Хорлин А. Я. *Биоорг. химия*, 1985, т. 11, № 5, с. 662-670.
13. Inman J. K., Merchant B., Claflin L., Tacey S. E. *Immunochem.*, 1973, v. 10, № 3, p. 165-174.
14. Flowers H. M., Shapiro D. J. *Org. Chem.*, 1965, v. 30, p. 2041-2043.
15. Bundle D. R., Gidney M. A., Kassman N., Rahman A. F. R. *J. Immunol.*, 1982, v. 129, № 2, p. 678-682.
16. Gray G. R. *Methods in Enzymol.*, 1978, v. L, part C, p. 155-160.
17. Фримель Х. *Иммунологические методы*. М.: Мир, 1979, с. 31-36.
18. Laemmli U. K., Favum M. J. *Mol. Biol.*, 1973, v. 80, № 4, p. 575-599.
19. Rahman A. F. R., Longenecker B. M. *J. Immunol.*, 1982, v. 129, № 5, p. 2021-2025.
20. Baenziger J. U., Fiete D. J. *J. Biol. Chem.*, 1979, v. 254, № 3, p. 789-795.
21. Lemieux R. U., Baker D. A., Bundle D. R. *Can. J. Biochem.*, 1977, v. 55, № 5, p. 507-512.
22. Springer G. F., Cantrell J. L., Desai P. R., Tegtmeier H. *Clin. Immun. and Immunopathol.*, 1982, v. 22, № 1, p. 29-35.
23. Фримель Х. *Иммунологические методы*. М.: Мир, 1979, с. 78-89.
24. Мотои Т., Сакакибара Н., Накэжима К., Шиномия Н., Нагаи Я. In: *Glycoconjugates/Eds Yamakawa T., Osawa T., Handa S.*, 1981, p. 93-96.
25. Wei-Feng C., Scollay R., Shortman K. *J. Immunol.*, 1982, v. 129, № 1, p. 18-24.
26. March S. C., Parich I., Cuatrecasas P. *Anal. Biochem.*, 1974, v. 60, № 1, p. 149-152.
27. Nakana P. K., Kawaoi A. *J. Histochem. and Cytochem.*, 1974, v. 22, № 12, p. 1084-1091.
28. Warren L. J. *J. Biol. Chem.*, 1959, v. 234, № 8, p. 1971-1975.

Поступила в редакцию
13.XII.1984

MONOSPECIFIC ANTIBODIES AGAINST ARTIFICIAL T-ANTIGEN, THEIR CHARACTERIZATION AND APPLICATION FOR IDENTIFICATION OF CELL SURFACE T-ANTIGENIC DETERMINANTS

MEDVEDEV A. É., GABRIELYAN N. D., BOVIN N. V., KHORLIN A. Ya.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Monospecific antibodies directed to a Thomsen-Friedenreich antigen (T-antigen) were obtained using artificial antigen. T-antigen immunodominant α -disaccharide Gal β (1 \rightarrow 3)GalNAc α 1-(T α) and its β -anomer Gal β (1 \rightarrow 3)GalNAc β 1-(T β) were bound to bovine serum albumin (BSA) and cytochrome C (CCC) through a spacer (sp= $-O(CH_2)_3NHCO(CH_2)_4CO-$) by the azide method to give neoglycoproteins T α -sp-BSA, T α -sp-CCC and T β -sp-BSA. Anti-T α antiserum was obtained by immunization of rabbits with T α -sp-BSA and then purified by sequential affinity chromatography on BSA-Sepharose and T α -sp-BSA-Sepharose to yield monospecific anti-T IgG antibodies. As elucidated by ELISA method, binding T α -sp-BSA to the antibodies was

inhibited by T_{α} -sp-CCC, T_{α} -sp-OEt, asialofetuin, T_{α} -OBzl, the activity of the inhibitors decreasing in the above order. Methyl β -galactopyranoside, benzyl 2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranoside, disaccharide Gal β (1 \rightarrow 3)GalNAc and H-sp-BSA were inactive. The inhibitory analysis suggests that both disaccharide moiety T_{α} - and a definite part of the spacer are important for the binding and that T_{α} -OCH₂ seems to be the minimal recognized structure. In immunoprecipitation tests the antibodies react with T_{α} -sp-BSA but not with T_{β} -sp-BSA, whereas peanut (*Arachis hypogaea*) lectin (PNL) precipitated both T_{α} - and T_{β} -sp-BSA. These data suggest the significance of the α -galactosaminide bond for the antibody recognition. Desialylated human erythrocytes (natural T-antigen) were effectively agglutinated with the antibodies. Murine cortical thymocytes (obtained by agglutination-sedimentation method using PNL) were agglutinated with the antibodies only partially (67%), while these cells as well as the cells unaffected by the antibodies were completely agglutinated with PNL. These results indicate to different contents of glycoproteins (T_{α}) and glycolipids (T_{β}) oligosaccharide determinants on the surface of cortical thymocytes species.