



УДК 57.083.3

© 1991 г.

*О. Е. Галанина, Е. И. Дерюгина\*, М. И. Лапенков\*,  
А. Е. Носырев\*, Е. Ю. Корчагина, Т. В. Землянухина,  
Н. В. Бовин*

## ЭПИТОПНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИ-А-АНТИТЕЛ

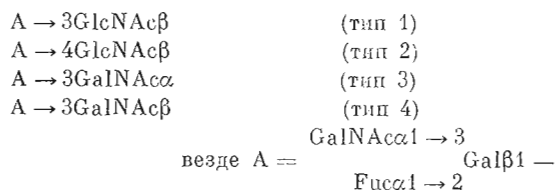
*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва;*

*\*Всероссийский гематологический научный центр МЗ СССР, Москва*

Изучена эпитопная специфичность трех моноклональных IgM-антител, 1H10, 3F9 и 44F9, агглютинирующих эритроциты группы крови А. Специфичность определена при помощи прямого связывания антител с полиакриламидными конъюгатами синтетических олигосахаридов, а также ингибирования связывания антител с природным антигеном синтетическими олигосахаридами и конъюгатами. Показано, что антитела 1H10 направлены против тетрасахарида А (тип 3), а антитела 3F9 и 44F9 взаимодействуют преимущественно с синтетическим трисахаридом А, причем для антител 44F9 вклад остатка  $\alpha$ -L-Fuc в связывание незначителен.

Выявлена корреляция между эпитопной специфичностью антител и их способностью агглютинировать эритроциты  $A_1$  и  $A_2$ .

Интерес к получению моноклональных антител (МА) против групповых антигенов крови системы АВО и установлению их эпитопной специфичности вызван несколькими причинами. Во-первых, недостаточно поняты особенности (в частности, конформационные) углеводных структур, выступающих в качестве антигенных детерминант. Во-вторых, анти-А-, анти-В- и анти-Н-МА уже широко применяются в трансфузиологии и судебной медицине для типирования, причем замена поликлональных антител моноклональными сопровождается острой полемикой относительно адекватности такой замены. Наконец, для АВН-антигенов, особенно А, характерен выраженный *серологический полиморфизм* (серологические варианты  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_x$  и т. д.) [1], который вызывает трудности при типировании эритроцитов, но должен учитываться при переливаниях крови, трансплантациях некоторых органов и при установлении причин иммунологического конфликта мать—плод. Параллельно серологическому имеет место также *структурный полиморфизм* АВН-антигенов [2]. Обнаружено четыре основных типа углеводных цепей, несущих терминальный трисахарид А:



Кроме того, А-цепи типа 2, доминирующие в эритроцитах, встречаются как в виде линейных, так и в виде разветвленных вариантов с дополнительной гетерогенностью по длине разветвлений («антенн»). Следует подчеркнуть, что молекулярная природа *серологического полиморфизма*

Сокращения: МА — моноклональные антитела; ПАА — полиакриламид; БСА — бычий сывороточный альбумин; sp — спейсер; для олигосахаридов  $sp = OCH_2 \cdot CH_2CH_2NHCOF_3$ , для ПАА-конъюгатов  $sp^1 = OCH_2CH_2CH_2$ ; ИФА — иммуноферментный анализ; АГ — антиген.

группоспецифических антигенов до сих пор малопонятна. Исключением является недавно найденное [3] молекулярное различие эритроцитов  $A_1$  и  $A_2$ , обусловленное присутствием цепей типа 3 (точнее, так называемого повторяющегося А) на  $A_1$ -эритроцитах (подробнее см. ниже).

В данной работе при помощи синтетических олигосахаридов и их полиакриламидных (ПАА) конъюгатов охарактеризована специфичность трех моноклональных анти-А-антител. МА 3F9 и 44F9 получены [4, 5] после иммунизации мышей эритроцитами А и отобраны из нескольких десятков анти-А-МА по ряду параметров, главным образом по способности агглютинировать эритроциты так называемых слабых подгрупп А (т. е. эритроциты  $A_2$ ,  $A_3$  и т. д., реагирующие со стандартными поликлональными сыворотками значительно слабее эритроцитов «сильной» подгруппы  $A_1$ ). Антитела 1H10 получены после иммунизации мышей клетками карциномной линии А431, происходящей от больного группы крови А, и отобраны по способности специфически агглютинировать эритроциты А.

### Ингибирование связывания МА

Эпитопную специфичность антител изучали методом иммуноферментного анализа (ИФА) в варианте ингибирования их связывания с природным антигеном — групповым веществом А, представляющим собой смесь

Таблица 1

Олигосахариды, их гликозиды и полиакриламидные конъюгаты, использованные в данной работе

Формула соединения	Краткое обозначения
$\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow \text{OSer-BCA}$	$T_n\text{-Ser-BCA}$
$\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow \text{OSer-цитохром}$	$T_n\text{-Ser-цитохром}$
$\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow \text{sp-ПАА}$	$T_n\text{-ПАА}$
$\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow \text{sp}$	$A_{di}$
$\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow \text{sp-ПАА}$	$A_{di}\text{-ПАА}$
$\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Gal}\beta 1 \rightarrow \text{sp}$	$\text{Fuc}2\text{Gal} (H_{di})$
$\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow \text{sp}$	$\text{GalNAcGalNAc}$
$\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow \text{sp}$ $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Gal}\beta 1 \rightarrow \text{sp}$	$A_{tri}$
$\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow \text{sp-ПАА}$ $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Gal}\beta 1 \rightarrow \text{sp-ПАА}$	$A_{tri}\text{-ПАА}$
$\text{Gal}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow \text{sp}$ $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Gal}\beta 1 \rightarrow \text{sp}$	$B_{tri}$
$\text{Gal}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow \text{sp-ПАА}$ $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Gal}\beta 1 \rightarrow \text{sp-ПАА}$	$B_{tri}\text{-ПАА}$
$\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow \text{sp}$	$H_{tri}(3)$
$\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow \text{sp-ПАА}$	$H_{tri}(3)\text{-ПАА}$
$\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc}$	$A_{tri}(1)$
$\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow \text{sp}$ $\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Gal}\beta 1 \rightarrow \text{sp}$	$(\text{GalNAc})_2\text{Gal}$
$\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc}$ $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Gal}\beta 1 \rightarrow \text{sp}$	$A_{tetr}(1)$
$\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow \text{sp}$ $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow \text{sp}$	$A_{tetr}(3)$
$\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow \text{sp-ПАА}$ $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow \text{sp-ПАА}$	$A_{tetr}(3)\text{-ПАА}$
$\text{Gal}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow \text{sp}$ $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow \text{sp}$	$B_{tetr}(3)$
$\text{Gal}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow \text{sp-ПАА}$ $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow \text{sp-ПАА}$	$B_{tetr}(3)\text{-ПАА}$
$\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{sp-ПАА}$ $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{sp-ПАА}$	$L_e^b\text{-ПАА}$

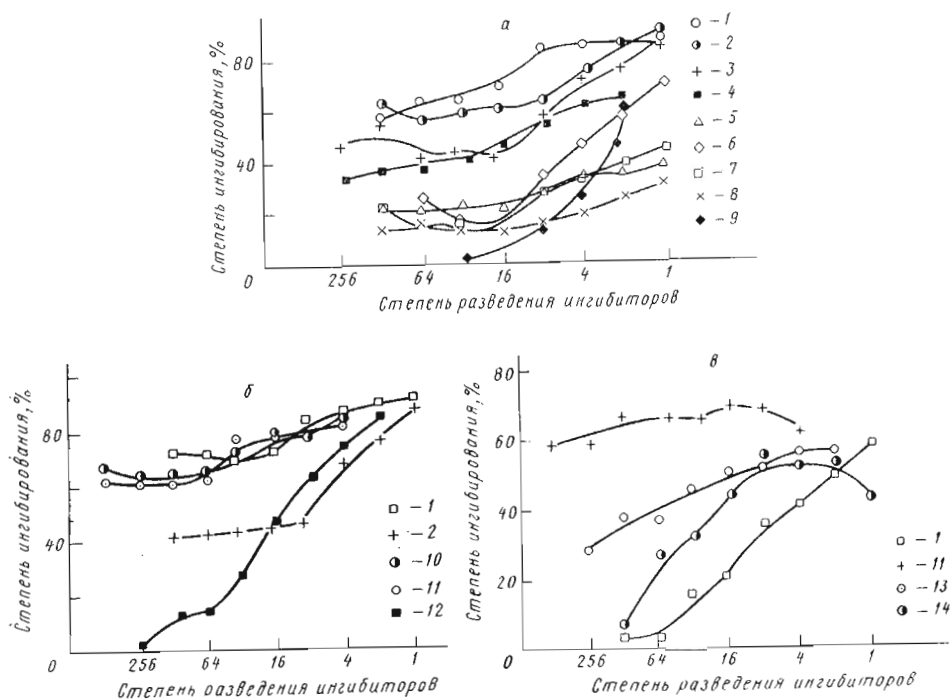


Рис. 1. Ингибирование связывания антител 44F9 (а), 3F9 (б) и 1H10 (в) с групповым веществом из эритроцитов  $A_1$  в ИФА синтетическими олигосахаридами и их конъюгатами (см. таблицы) и групповым веществом  $A_1(A_{\text{трирп}})$ . Начальная концентрация ингибиторов 1 мг/мл. 1 —  $A_{\text{трирп}}$ , 2 —  $A_{\text{три}}$ , 3 —  $(\text{GalNAc})_2\text{Gal}$ , 4 —  $A_{\text{три}}\text{-ПAA}$  (30%), 5 —  $A_{\text{три}}\text{-ПAA}$  (5%), 6 —  $A_{\text{ди}}$ , 7 —  $A_{\text{ди}}\text{-ПAA}$ , 8 —  $T_n\text{-Ser}$ —цитохром, 9 —  $\text{GalNAcGalNAc}$ , 10 —  $A_{\text{три}}\text{-ПAA}$ , 11 —  $A_{\text{тетр}}$  (3)—ПAA, 12 —  $A_{\text{тетр}}$  (1), 13 —  $H_{\text{три}}$  (3)—ПAA, 14 —  $A_{\text{тетр}}$  (3)

гликопротеинов, выделенных из эритроцитов  $A_1$ . В качестве ингибиторов использовали синтетические олигосахариды и их макромолекулярные формы — конъюгаты с ПAA (см. табл. 1); в водорастворимых конъюгатах каждое 10-е звено полимера содержало группу гликозил— $\text{O}(\text{CH}_2)_3$  [6]. В качестве матрицы был выбран ПAA, а не более традиционный БСА, поскольку в растворе представляет собой статистический клубок; это давало основание предполагать, что гаптенные группировки, не жестко фиксированные на матрице, будут обладать большим числом степеней свободы для подстраивания к антигенсвязывающему участку антитела.

Результаты конкурентного ингибирования представлены на рис. 1. Видно, что антитела 44F9 проявляют максимальное сродство к трисахаридной детерминанте А ( $A_{\text{три}}$ , см. таблицу) и значительно слабее взаимодействуют с дисахаридным ( $A_{\text{ди}}$ ) и моносахаридным (в  $\alpha$ -конфигурации,  $T_n\text{-Ser}$ —цитохром) фрагментами. С более сложными структурами — тетрасахаридами  $A_{\text{тетр}}$  (1) и  $A_{\text{тетр}}$  (3), фрагментом которых является  $A_{\text{три}}$ , — МА 44F9 вообще не взаимодействовали.

Таким образом, МА 44F9 не взаимодействуют с тетрасахаридами типов 1 и 3, но реагируют с трисахаридом А и природным веществом А, в котором, согласно данным литературы [7], найдены только цепи А типа 2. Полученные данные позволяют предположить, что на эритроцитах антитела 44F9 узнают детерминанты цепей типа 2.

Существенное ослабление ингибирующего эффекта для МА 44F9 наблюдалось при использовании вместо  $A_{\text{три}}$  и  $A_{\text{ди}}$  их ПAA-производных (что не было характерно для МА 3F9 и 1H10, см. ниже). Неожиданно также, что трисахарид  $(\text{GalNAc})_2\text{Gal}$ , весьма далекий от природного антигена аналог трисахарид А (в котором  $\alpha$ -L-фукозилльный остаток заменен на  $\alpha$ -D-GalNAc), обладал близкой к  $A_{\text{три}}$  активностью. По-видимому, максимальный вклад во взаимодействие  $A_{\text{три}}$  с антителами 44F9 вносит

Результаты теоретического конформационного анализа группоспецифических олигосахаридов типов 1–4 [9]

Олигосахарид	Углы вращения между моносахаридными остатками, град				Сближенность метильной группы Fuc и ацетамидного остатка гексозамина
	Gal → Fuc		Gal → GalNAc (или GlcNAc)		
	$\varphi$	$\psi$	$\varphi$	$\psi$	
H (тип 1)	53	11	67	11	Сближены
H (тип 2)	56	16	45	-5	Разделены
H (тип 3)	57	15	30	-63	Очень близки
H (тип 4)					
A (тип 1) *	56	11	69	10	Сближены

\* В работе [9] не рассматривались тетрасахариды A других типов, поэтому здесь сравниваются трисахариды H. Однако, как видно из сопоставления первой и последней строк таблицы, вращение остатка GalNAc не изменяет углов  $\varphi$  и  $\psi$ .

фрагмент GalNAc $\alpha$ 1  $\rightarrow$  3Gal $\beta$ , в то время как остаток фукозы вносит свой вклад не столько за счет непосредственного взаимодействия с МА, сколько путем увеличения конформационной жесткости фрагмента GalNAc $\alpha$ 1  $\rightarrow$  3Gal $\beta$ , уменьшая подвижность моносахаридных остатков вокруг связи  $\alpha$ 1  $\rightarrow$  3. В этом смысле моносахаридные остатки  $\alpha$ -L-Fuc и  $\alpha$ -D-GalNAc при O-2 могут оказывать сходное влияние, а именно делать конформационно более жестким фрагмент GalNAc $\alpha$ 1  $\rightarrow$  3Gal $\beta$ . Интересно, что терминальный дисахарид антигена Форсмана, GalNAc $\alpha$ 1  $\rightarrow$  3GalNAc $\beta$ , в котором благодаря образованию водородной связи между Ac-группой «правого» остатка GalNAc и 3-OH-группой «левого» [8] диэдральные углы  $\varphi$  и  $\psi$  между моносахаридными звеньями сильно изменены по сравнению с дисахаридом GalNAc $\alpha$ 1  $\rightarrow$  3Gal, значительно уступает последнему как ингибитор.

Итак, МА 44F9 преимущественно взаимодействуют с трисахаридом A и, по-видимому, направлены к тетрасахариду A (тип 2), причем вклад фукозильного звена в связывание незначителен.

Наиболее эффективными ингибиторами антител 2F9 оказались трисахарид A<sub>tri</sub>, включающие этот структурный фрагмент тетрасахариды типов 1 и 3 A<sub>tetr</sub>(1) и A<sub>tetr</sub>(3), а также природный гликопротеин, содержащий цепи типа 2. В отличие от МА 44F9 антитела 3F9 не взаимодействовали с дезфукозопроизводными: A<sub>di</sub>, GalNAc $\alpha$ 1  $\rightarrow$  3GalNAc $\beta$ , (7GalNAc)<sub>2</sub>Gal и A<sub>tri</sub>(1), т. е. фукозильный остаток антигена является существенно необходимым для взаимодействия с МА 3F9. Полимерные антигены A<sub>tri</sub>-ПАА и A<sub>tetr</sub>(3)-ПАА ингибировали МА 3F9 заметно сильнее, чем соответствующие мономеры (рис. 1б).

Таким образом, антигенсвязывающий центр антител 3F9, по-видимому, специфичен к трисахариду A, и антитела способны связываться с A-детерминантой на олигосахаридных цепях любого типа.

Антитела 1H10 показали высокую специфичность по отношению к тетрасахариду A типа 3, A<sub>tetr</sub>(3). Отсутствие терминального остатка GalNAc приводит к резкому уменьшению ингибирующей способности, о чем свидетельствует низкая ингибирующая способность H<sub>tri</sub>(3)-ПАА и H<sub>tri</sub>(3) (рис. 1а) по сравнению с соответствующими производными тетрасахаридом A типа 3. Внутренний остаток GalNAc в A<sub>tetr</sub>(3) также является иммунодоминантным: его отсутствие (см. A<sub>tri</sub>) или замена на GlcNAc (см. A<sub>tetr</sub>(1)) драматически сказывается на взаимодействии с МА 1H10. Отсутствие ингибирования антител 1H10 цепями типа 1 (A<sub>tetr</sub>(1)) и слабое ингибирование цепями типа 2 (природное вещество) на первый взгляд представляются довольно неожиданными. Объяснить это можно с привлечением результатов теоретического конформационного анализа. По данным работы [9], трисахариды H различных типов существенно разли-

чаются по величине углов вращения вокруг гликозидной связи Gal → GalNAc (или GlcNAc) (табл. 2), что является причиной существенно различного взаимного пространственного расположения двух гидрофобных метильных групп: фукозы ( $\text{CH}_3^{\text{Fuc}}$ ) и ацетамидной группировки гексозамина ( $\text{CH}_3^{\text{GN}}$ ), вносящих значительный вклад во взаимодействие с антителом: в олигосахаридах типа 3 группы  $\text{CH}_3^{\text{Fuc}}$  и  $\text{CH}_3^{\text{GN}}$  образуют гидрофобный кластер, в олигосахаридах типа 1 кластер более рыхлый, а в олигосахаридах типа 2 такого кластера нет. Поэтому антитела к жесткой компактной детерминанте типа 3 могут не узнавать очень близкие по первичной структуре, но конформационно иные фрагменты.

Столь высокое соответствие антигену типа 3 антител 1H10, полученных к рецептору эпидермального фактора роста клеток A431, наводит на мысль о наличии антигена А (тип 3) в составе самого рецептора.

### Прямое связывание антител с синтетическими антигенами

Если ингибирование взаимодействия антител с антигеном при помощи мономерных форм олигосахаридов характеризует взаимодействие *единичного* антигенсвязывающего участка, то эксперименты по прямому связыванию позволяют одновременно учитывать и топографию взаимодействия антител (в данном случае IgM) как поливалентных образований. Результаты прямого связывания (на нитроцеллюлозных мембранах, техника dot blot) представлены на рис. 2.

Антитела 1H10 хорошо связываются с  $A_{\text{tet}}(3)$ -ПАА и  $H_{\text{tri}}(3)$ -ПАА, несколько слабее с  $B_{\text{tet}}(3)$ -ПАА и значительно слабее с трисахаридным вариантом А, что в общих чертах (хотя и не целиком) согласуется с данными по ингибированию (ср. рис. 2а и 1е). Отличие результатов по прямому связыванию от результатов ингибирования можно охарактеризовать как расширение специфичности МА: те антигены, которые в конкурентных условиях ингибирования взаимодействовали с МА незначительно, в условиях прямого связывания (и при большей чувствительности метода) показали высокую активность.

Антитела 3F9, которые одинаково ингибировались трисахаридом и тетрасахаридом ( $A_{\text{tri}}$ -ПАА и  $A_{\text{tet}}(3)$ -ПАА), в прямом связывании предпочтительно реагировали с последним (рис. 2б).

Антитела 44F9, взаимодействие которых с природным веществом слабо ингибировали полимерные антигены в условиях ИФА (рис. 1), в прямой постановке также значительно слабее (примерно в 5 и 25 раз по сравнению с МА 3F9 и 1H10 соответственно, что видно из сопоставления шкал интенсивностей на рис. 2а—е) связывались с ПАА-олигосахаридами, причем максимум связывания приходился на  $A_{\text{di}}$ -ПАА. Данные по прямому связыванию МА 44F9 и его ингибированию позволили предположить исключительную важность для этих антител топографии (эпитопной плотности) антигенных детерминант, поэтому ингибирование было повторено на ПАА-производном трисахарида  $A_{\text{tri}}$ , в котором гаптенных группировок втрое больше, чем обычно; результат представлен на рис. 1в: ингибирующая активность конъюгата возрастает на несколько порядков и становится равной активности природного антигена. Еще более значителен эффект в системе прямого связывания (рис. 3): 30%-ный конъюгат трисахарида А на несколько порядков превосходит не только 10%-ный, но и природный гликопротеин из эритроцитов.

### Специфичность МА по отношению к эритроцитам различных подгрупп

При определении группы крови необходимым условием является взаимодействие антител не только с эритроцитами  $A_1$ , но и с вариантами  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_x$  и др. В соответствии с этим анти-А-реагенты для рутинного типирования должны иметь максимально широкую А-специфичность, т. е. узнавать максимальное число вариантов А-антигена эритроцитов. В то же время такой реагент не должен реагировать с «А-подобными» антигенами,



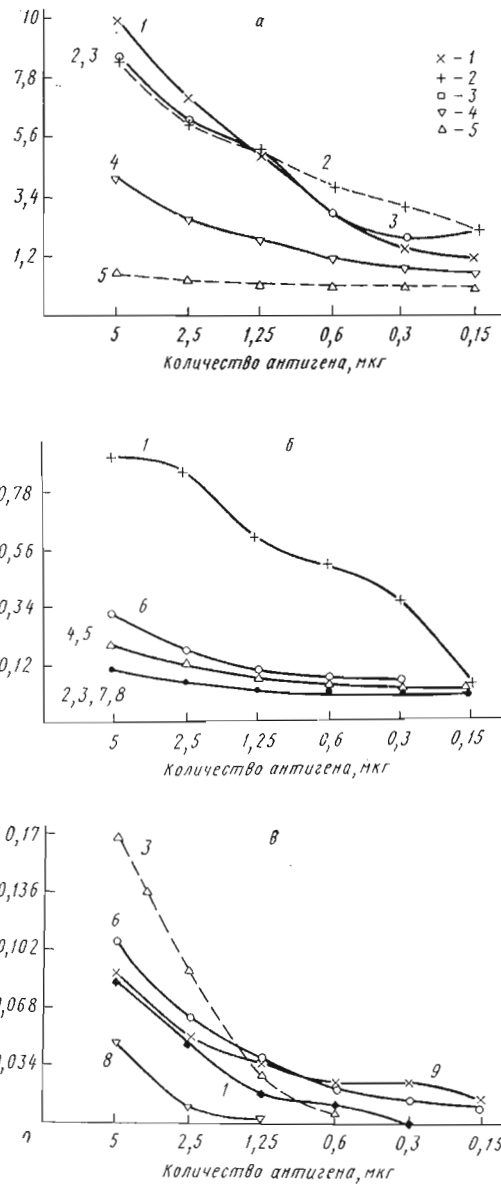


Рис. 2. Прямое связывание антител 1Н10 (а), 3F9, (б), 44F9 (в) с групповыми веществами из эритроцитов и синтетическими конъюгатами. По оси ординат отложена интегральная оптическая плотность дота. 1 —  $A_{tetr}(3)$ -ПАА, 2 —  $H_{прир}$ , 3 —  $H_{tri}(3)$ -ПАА, 4 —  $B_{tetr}(3)$ -ПАА, 5 —  $T_n$ -Ser — цитохром, 6 —  $A_{прир}$ , 7 —  $B_{прир}$ , 8 —  $A_{tri}$ -ПАА, 9 —  $A_{di}$ -ПАА

такими, как антиген Форссмана и  $T_n$ , имеющими терминальный остаток  $GalNAc\alpha$ . Для целенаправленного отбора МА, узнающих все подгруппы  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  и т. д. В настоящее время выяснена природа молекулярных различий только между вариантами  $A_1$  и  $A_2$  [3, 7]. Количественное различие заключается в значительно меньшем (примерно в 5 раз) числе А-детерминант на эритроцитах  $A_2$ , однако решающую роль играет качественное различие. На эритроцитах  $A_1$  экспрессируются структуры А (тип 3), причем в значительных количествах (по оценке, сделанной в работе [10], около половины всех А-детерминант), в то время как на эритроцитах  $A_2$  их практически нет, но накапливается биосинтетический предшественник — антиген Н (тип 3), структура которого включает фрагмент антигена А.

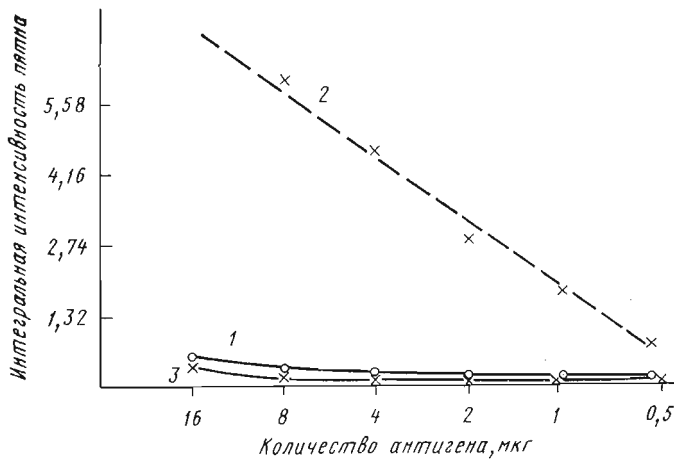
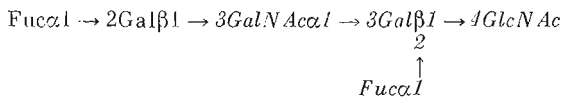


Рис. 3. Прямое связывание антител 44F9 с природным веществом из эритроцитов  $A_{\text{прир}}$  (1) и синтетическими конъюгатами  $A_{\text{три}}\text{-ПАА}$  (30%) (2) и  $A_{\text{три}}\text{-ПАА}$  (10%) (3)

(тип 2) (выделен курсивом),



что позволяет его также называть А-ассоциированным антигеном Н.

На основании приведенных данных о химической структуре антигенов эритроцитов  $A_1$  и  $A_2$  можно предположить, что универсальный типизирующий реагент для агглютинации как  $A_1$ -, так и  $A_2$ -эритроцитов должен либо быть строго направленным к терминальному трисахариду А и, следовательно, нечувствительным к типу цепи, а также эпитоппной плотности антигенов А, экспрессированных на эритроцитах  $A_2$  довольно редко \*, либо распознавать как антигены А (тип 3), так и Н (тип 3), т. е. взаимодействовать с внутренним, трисахаридным участком тетрасахарида  $A_{\text{тетр}}$ (3).

Учитывая полученные данные об эпитоппной специфичности, интересно сравнить способность изучаемых МА агглютинировать различные варианты эритроцитов А.

Как видно из табл. 3, все варианты антигена А в 100% случаев были выявлены лишь антителами 3F9, антигенсвязывающий центр которых направлен к трисахариду А. Способность МА 3F9 агглютинировать А-эритроциты всех исследованных подгрупп хорошо коррелирует с нечувствительностью этих МА к типу цепи. Следует, однако, отметить, что при широкой специфичности для МА 3F9 характерен относительно низкий авидитет в реакции агглютинации эритроцитов.

При использовании МА 44F9, антигенсвязывающий центр которых, как мы считаем, направлен к тетрасахариду А (тип 2), наблюдается уменьшение процента выявления антигена А в реакции агглютинации в ряду подгрупп  $A_1 \rightarrow A_x$ . Этот факт находится в соответствии с полученными данными о большей (по сравнению с МА 3F9) чувствительности этих антител к эпитоппной плотности гаптенон, а также известными из литературы [7, 11] данными о снижении экспрессии цепей А (тип 2) в слабых подгруппах (см. выше).

Антитела 1H10, направленные к тетрасахариду А (тип 3) и взаимодействующие с трисахаридом Н (тип 3), выявляли только 50% образцов эритроцитов  $A_2$  и даже не все (69 из 70) образцы  $A_1$ . Слабая выявляемость эритроцитов  $A_2$  антителами 1H10 обусловлена, по-видимому, тем, что структур  $A_{\text{тетр}}$ (3) на эритроцитах  $A_2$  существенно меньше, поскольку гли-

\* Относительно низкая плотность антигенов А типа 2 вызвана, во-первых, более низкой активностью  $A_2$ -гликозилтрансферазы по сравнению с  $A_1$ -ферментом и, во-вторых, дальнейшим гликозиллированием структур А типа 2.

Частота выявления независимо типированных вариантов А-эритроцитов тремя МА в реакции гемагглютинации

МА	Число (%) выявленных образцов эритроцитов вариантов				
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>weak</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>x</sub>
3F9	428/428(100)	63/63(100)	2/2(100)	2/2(100)	2/2(100)
44F9	937/937(100)	168/168(100)	2/2(100)	0/2(0)	0/0
1H10	69/70(99)	6/12(50)	Не определялись		

Таблица 4

Взаимодействие некоторых МА с вариантами эритроцитов А и группоспецифическими антигенами типа 3

Антитела	Взаимодействие с эритроцитами	Взаимодействие с синтетическими АГ или гликолипидами типа 3	Иммуноген	Литература
TH-1	A <sub>1</sub> + A <sub>2</sub> -	A+ H-	Эритроциты	[10]
TS-1	A <sub>1</sub> + A <sub>2</sub> -	A+ H+-	»	[12]
H1R8	A <sub>1</sub> + A <sub>2</sub> +	A+ H+ B+	»	[12]
M2	A <sub>1</sub> + A <sub>2</sub> +	A+ H+	Опухолевая линия клеток SK-RS-28	[13]
P1A2	A <sub>1</sub> + A <sub>2</sub> +	A+ H+	Человеческие гибридомы	[14]
MBr1	A <sub>1</sub> + A <sub>2</sub> +	A+ (тип 4) H+	?	[15]
1H10	A <sub>1</sub> + A <sub>2</sub> + (A <sub>2</sub> >A <sub>1</sub> )	A+ H+-	Опухолевая линия клеток A431	

козилтрансфераза A<sub>2</sub> не способна модифицировать их предшественник — А-ассоциированную цепь Н типа 3. В то же время взаимодействие МА 1H10 с последней (о чем можно судить по реакции с H<sub>tri</sub>(3)), представленной на эритроцитах A<sub>2</sub> в значительном количестве, по-видимому, недостаточно выражено, чтобы приводить к надежной агглютинации эритроцитов A<sub>2</sub>. Интересно в этой связи сравнить МА 1H10 с довольно близкими по специфичности антителами, описанными в литературе [10, 12—15]. Из табл. 4 видно, что способность МА агглютинировать эритроциты A<sub>1</sub> и A<sub>2</sub> коррелирует с их способностью взаимодействовать с антигенами типа 3 (А и Н).

Изучение эпитопной специфичности антител 1H10, 44F9 и 3F9 позволяет сделать вывод о том, что все они значительно различаются, но ни одно из них, как и более 10 МА, проанализированных в работах [16, 17], не соответствует критериям «идеального» реагента. По-видимому, имеют смысл дальнейшие, направленные поиски новых анти-А-моноклональных антител. Иной путь качественного улучшения анти-А-реагентов для типирования крови состоит в комбинировании антител и создании олигоклональных реагентов.

### Экспериментальная часть

Моноклональные антитела 1H10 (IgM) получены от проф. Н. Н. Никольского (Институт цитологии АН СССР, Ленинград) в виде асцитной жидкости и использовались в разведении 1 : 1000. Антитела 3F9 и 44F9 (оба IgM) получены от проф. И. Л. Чертова (Всесоюзный гематологический научный центр МЗ СССР, Москва) в виде культуральных жидкостей и использовались в разведении 1 : 40.

*Антигены и олигосахариды.* Природное групповое вещество А, использованное для сенсibilизации планшетов и в ингибиторном анализе, представляет собой суммарную белок-гликопротеиновую фракцию теней эри-



троцитов донора группы крови  $A_1$  (фирма ТТМ, Москва). Синтетические олигосахариды типа 1 ( $A_{tri}(1)$  и  $A_{tet}(3)$ ) [18]) использовали в свободном (неспейсерированном) виде; остальные олигосахариды (табл. 1) — в виде гликозидов спейсера,  $sp = -OCH_2CH_2CH_2NHCOCF_3$  [19]. Водорастворимые ПАА-антигены [6] представляют собой полиакриламид средней степени полимеризации около 1000, каждое 10-е звено которого содержит заместитель — спейсерированный углевод [6].  $T_n$ -Ser—BCA содержит 2% (по весу) GalNAc, а  $T_n$ -Ser—цитохром  $c$  — 2,5% GalNAc [20].

В работе использовали желатин (Sigma), твин-20 (Sigma), антитела против иммуноглобулинов мыши (IgM), меченные пероксидазой хрена, предприятий «Кайу» (Эстония) и «БиоС» (Новосибирск), и планшеты из полистирола NUNC-Immuno-Plate-I- (Nunc, Дания).

*Ингибиторный анализ.* Для получения количественных данных ИФА использовали прибор Multiskan МК II (Titertek, Финляндия). 96-Луночные планшеты сенсбилизировали веществом А из эритроцитов человека (10 мкг/мл, карбонатный буфер, рН 9,6, по 100 мкл в лунку) в течение 2 ч при 37° С, затем 15 ч при 4° С, планшеты отмывали фосфатным буфером (рН 7,4), содержащим 0,05% твин-20; затем обрабатывали 0,1% желатином в фосфатном буфере в течение 1 ч при 37° С. Антитела в объеме 100 мкл (предварительно подобрали оптимальную концентрацию) смешивали в лунках планшетов с сериями 2-кратных разведений ингибиторов (начальная концентрация 1 мг/мл) и инкубировали 2 ч при 37° С. После отмывки связавшиеся МА обнаруживали при помощи конъюгата пероксидазы из хрена с антителами против иммуноглобулинов мыши, в качестве субстрата использовался о-фенилендиамин.

*Связывание на нитроцеллюлозной мембране.* На нитроцеллюлозную мембрану (размер пор 45 мкм; Schleicher und Schüll, ФРГ) наносили по 10 мкл раствора ПАА-конъюгата в последовательных 2-кратных разведениях (начальная концентрация 1 мг/мл), мембрану высушивали 30 мин при 37° С, затем выдерживали 1 ч при 20° С в растворе МА (гемагглютинирующий титр 1 : 64) на ротационном шейкере, после чего промывали фосфатно-солевым буфером, содержащим 0,3% твин-20, четыре раза по 5 мин. После отмывки мембраны инкубировали 2 ч при 20° С в растворе пероксидазного конъюгата, разведенного в 500 раз тем же буфером, промывали по приведенной выше схеме и обрабатывали 30 мин раствором субстрата (0,25% перекиси водорода и 0,05% 4-хлор-1-нафтола в фосфатно-солевом буфере). Интегральную интенсивность пятен оценивали при помощи лазерного денситометра Gel Scan XL (ЛКВ, Швеция).

Геагглютинацию проводили на фарфоровых пластинках, смешивая 20 мкл раствора антител и 20 мкл 5%-ной суспензии эритроцитов при комнатной температуре. Результат определяли визуально через 10 мин.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Race R. R., Sanger R. // Blood groups in man / Oxford: Blackwell Scientific, 1975. P. 8—91.
2. Nakomori S. // Amer. J. Clin. Pathol. 1984. V. 82. № 3. P. 635—648.
3. Clausen H., Watanabe K., Kannagi R., Levery S. B., Nudelman E., Arao-Tomono Y., Nakomori S. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1984. V. 124. № 2. P. 523—529.
4. Дерюгина Е. И., Дризе Н. И., Леменева Л. Н., Удалов Г. А., Чертков И. Л. // Биотехнология. 1988. Т. 4. № 1. С. 108—113.
5. Дерюгина Е. И., Дризе Н. И., Леменева Л. Н., Удалов Г. А., Чертков И. Л., Макарова Е. М., Гуртовой И. М. // Гематология и трансфузиология. 1988. Т. 33. № 10. С. 23—29.
6. Bovin N. V., Byrtaeva N. E., Zemlyanukhina T. V., Korchagina E. Yu. // Eurocarb V. 1989. Abstracts. P. C-72.
7. Clausen H., Nakomori S. // Vox Sang. 1989. V. 56. № 1. P. 1—20.
8. Yadav J. C., Luger P. // Carbohydr. Res. 1983. V. 119. № 1. P. 57—73.
9. Веровский В. Е. Теоретический конформационный анализ углеводных цепей гликопротеинов. Автореферат дис. ... канд. хим. наук. М.: ИОХ АН СССР, 1986. С. 6—11.
10. Clausen H., Levery S. B., Nudelman E., Tsuchiya S., Nakomori S. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 4. P. 1199—1203.
11. Lubenko A., Ivanyi J. // Vox Sang. 1986. V. 51. № 2. P. 136—142.

12. *Le Pendu J., Lambert F., Samuelsson B., Breimer M. E., Seits R. C., Urdaniz M. P., Suesa N., Ratcliffe M., Francois A., Poschmann A., Vinas J., Oriol R.* // *Glycoconj. J.* 1985. V. 3. № 2. P. 255—271.
13. *Furukawa K., Clausen H., Hakomori S., Sakamoto J., Look K., Lundblad A., Matthes M. J., Lloyd K. O.* // *Biochemistry.* 1985. V. 24. № 26. P. 7820—7826.
14. *Gane P., Vellayoudom J., Mollicone R., Breimer M. E., Samuelsson B. E., Rouger P., Gerard G., Le Pendu J., Oriol R.* // *Vox Sang.* 1987. V. 53. № 2. P. 117—125.
15. *Clausen H., Levery S. B., Kannagi R., Hakomori S.* // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. № 3. P. 1380—1387.
16. *Chen H.-T., Kabat E.* // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. № 24. P. 13208—13217.
17. *Gooi H. C., Hounsell E. F., Picard J. K., Lowz A. D., Voak D., Lennox E. D., Feizi T.* // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. № 24. P. 13218—13224.
18. *Bovin N. V., Zurabyan S. E., Khorlin A. Ya.* // *Carbohydr. Res.* 1983. V. 112. № 1. P. 23—35.
19. *Бовин Н. В., Иванова И. А., Хорлин А. Я.* // *Биоорганик. химия.* 1985. Т. 11. № 5. С. 662—670.
20. *Бовин Н. В., Землянухина Т. В., Хорлин А. Я.* // *Биоорганик. химия.* 1985. Т. 11. № 9. С. 1256—1264.

Поступила в редакцию  
25.IV.1990

O. E. GALANINA, E. I. DERYUGINA \*, M. I. LAPENKOV \*, A. E. NOSYREV \*,  
E. Yu. KORCHAGINA, T. V. ZEMLYANUKHINA, N. V. BOVIN

#### EPIOTOPE SPECIFICITY OF HEMAGGLUTININATING MONOCLONAL ANTI-A ANTIBODIES

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow; \* All-Union  
Hematological Scientific Centre, Ministry of Health of the USSR, Moscow*

Fine epitope specificity of three anti-A monoclonal antibodies (MA) 1H10, 3F9, and 44F9 was studied by: 1) direct MA binding to synthetic oligosaccharides (OS) linked to polyacrylamide matrix, and 2) inhibition of MA binding to natural antigen by synthetic OS and their polyacrylamide conjugates. It has been established that the antigen binding site of MA 1H10 is specific for tetrasaccharide A (type 3), whereas MAs 3F9 and 44F9 recognize trisaccharide A, the contribution of  $\alpha$ -L-fucosyl residue being insignificant in the case of 44F9 binding. The correlation of the MAs epitope specificity with their ability to agglutinate red blood cells of A<sub>1</sub> and weak A subgroups is discussed.