



УДК 57.083.3

© 1991 г.

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

ЭПИТОПНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИ-В-АНТИТЕЛ

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

* Всесоюзный гематологический научный центр МЗ СССР, Москва

Исследована эпитопная специфичность 10 моноклональных антител, агглютинирующих эритроциты группы крови В. Для определения специфичности использовали три метода: прямое связывание антител с полиакриламидными конъюгатами синтетических олигосахаридов (на нитроцеллюлозных мембранах); прямое связывание антител с синтетическими олигосахаридами, иммобилизованными на макропористом стекле; ингибирование связывания антител с природным антигеном синтетическими олигосахаридами и конъюгатами (твердофазный ИФА). Изученные антитела взаимодействуют с трисахаридом Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal, являющимся группоспецифической В-трисахаридной детерминантой, независимо от способности дискриминировать серологические варианты внутри группы В. Антитела, отличающиеся от остальных способностью агглютинировать любые эритроциты В, взаимодействуют также с синтетическим тетрасахаридом Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc, являющимся группоспецифической детерминантой В типа 3.

Для эритроцитов групп крови А и В системы АВО человека характерен серологический полиморфизм, выражающийся в наличии так называемых сильных (A₁, В) и слабых (A₂, A₃, A_x, A_m; В₃, В_x и др.) подгрупп. Для подгрупп, как правило, не выявлен специфический антиген, а принадлежность к той или иной подгруппе устанавливается по совокупности таких серологических параметров, как взаимодействие эритроцитов с поликлональными сыворотками и лектинами, статус секреции групповых веществ АВН в слюну и сыворотку, наличие анти-А- и анти-В-антител и др. [1, 2].

Молекулярная природа серологических различий выяснена только для A₁- и A₂-вариантов антигена А [3]. Количественная разница заключается в значительно меньшем (примерно в 5 раз) числе мест связывания анти-А-антител на эритроцитах A₂ по сравнению с эритроцитами A₁. Качественная разница выражается в преимущественной экспрессии на эритроцитах A₁ углеводных цепей А типа 3 (называемых также *repetitive A*), а на эритроцитах A₂ — цепей Н типа 3 (называемых также *А-ассоциированными цепями Н*). Выказано также предположение, что на эритроцитах A₂ детерминанты А экспрессированы на разветвленных гликолипидах, в то время как эритроциты A₁ обогащены линейными структурами [4].

Существуют ли различия в химической природе группоспецифических углеводных цепей эритроцитов различных подгрупп В, пока неизвестно. Для установления природы различий вариантов антигена В можно воспользоваться двумя подходами. Первый заключается в выделении из эритроцитарных мембран специфических для данной подгруппы гликолипидов и (или) гликопротеинов с последующим установлением их химической структуры. Второй подход может быть основан на определении (с помощью широкого набора синтетических и природных антигенов) эпитопной спе-

Сокращения: МА — моноклональные антитела; ПАА — полиакриламид; БСА — бычий сывороточный альбумин; sp — спейсер: для олигосахаридов sp = OCH₂CH₂CH₂·NHCOF₃, для ПАА-конъюгатов sp¹ = OCH₂CH₂CH₂; АГ — антиген; ИФА — иммуноферментный анализ.

дифичности моноклональных антител, по-разному реагирующих с эритроцитами различных подгрупп В. В случае обнаружения корреляции между эпитопной специфичностью антител и их способностью реагировать с разными вариантами эритроцитов В можно было бы заключить, имеется ли в составе эритроцитов данного фенотипа В специфичная углеводная цепь, а затем ее идентифицировать.

В данной работе при помощи синтетических олигосахаридов и их полиакриламидных конъюгатов изучена эпитопная специфичность 10 моноклональных анти-В-антител, различающихся способностью агглютинировать эритроциты разных подгрупп В и преципитировать растворимую форму природного антигена (В-вещество слюны). Углеводы для изучения специфичности антител выбраны таким образом, чтобы охватить максимально широкий круг группоспецифических структур, их фрагменты, а также все доступные олигосахариды с α -галактозидной связью, так как α -галактоза является иммунодоминантным моносахаридом В-детерминанты.

Анти-В-антитела А10, В8, В11, D2, F2, G10 и Н10 (все класса М) получены в лаборатории физиологии кроветворения Всесоюзного гематологического центра МЗ СССР [5, 6]. В качестве иммуногена использовали эритроциты группы В. Антитела L26 (IgM), L37 (IgA) и L40 (IgM) были выбраны из широкой панели анти-В-МА, разосланных рабочим совещанием Второго международного симпозиума по моноклональным антителам против антигенов эритроцитов человека (Лунд, Швеция, 1990 [7]). Критерием отбора данных антител была их способность агглютинировать все В-эритроциты, включая подгруппы V_x и V_{weak} .

Ингибирование связывания МА в ИФА

Эпитопную специфичность анти-В-антител изучали в реакции ингибирования их связывания с природным антигеном — групповым веществом В (V_{nat}), которое представляет собой смесь гликопротеинов, выделенных из пула эритроцитов доноров группы крови В. Природным антигеном сенсibilизировали 96-луночные планшеты из полистирола, затем в лунки последовательно вносили антитела в оптимальной (предварительно подобранной) концентрации и углеводные ингибиторы связывания в двукратных разведениях. В качестве ингибиторов брали синтетические олигосахариды и их макромолекулярные формы — конъюгаты с ПАА (см. табл. 1) с разным содержанием углеводных лигандов; в особо не отмеченных случаях одна группа *гликозил-O(CH₂)₃* приходилась на 10 звеньев —CH₂СН— полимерной цепи ПАА (10%-ный конъюгат); использовались также 5, 30%-ный и другие конъюгаты; синтез ПАА-производных олигосахаридов приведен в работах [8, 9].

В отличие от традиционно используемого БСА ПАА в качестве матрицы для конъюгатов позволяет получать производные с любым заранее заданным содержанием углеводных групп, синтезировать серии производных с плавно меняющимся содержанием углеводов, менять заряд и форму молекулы конъюгата. В качестве ингибиторов использовали также два природных антигена: V_{nat} и вещество слюны донора группы крови В (V_{sal}). На V_{nat} , согласно [1], найдены почти исключительно цепи типа 2 (β -галактоза присоединена к глюкозамину связью 1—4), а на V_{sal} — преимущественно типа 1 (β -галактоза присоединена к глюкозамину связью 1—3).

Gal α 1-3		Gal α 1-3]		Gal α 1-3	
	Gal β 1-3GlcNAc β		Gal β 1-4GlcNAc β		Gal β 1-3GalNAc α
Fuc α 1-2	тип 1	Fuc α 1-2	тип 2	Fuc α 1-2	тип 3

Результаты ингибирования синтетическими олигосахаридами и их ПАА конъюгатами (см. табл. 1) связывания МА с природным веществом V_{nat} представлены на рис. 1, на котором кривые ингибирования приведены только для наиболее активных соединений. Как видно, изученные антитела взаимодействовали предпочтительно с трисахаридной детерминантой В (в форме 30%-ного ПАА-конъюгата) или V_{sal} , причем в ряде случаев

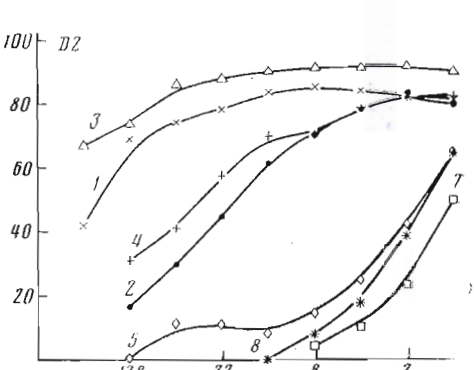
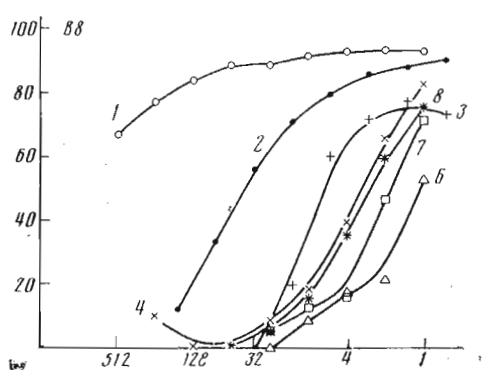
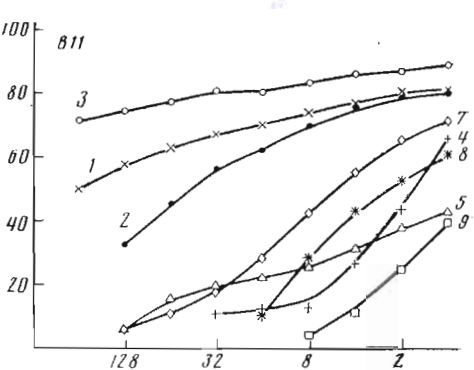
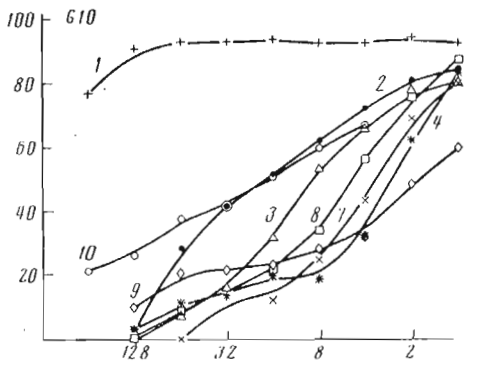
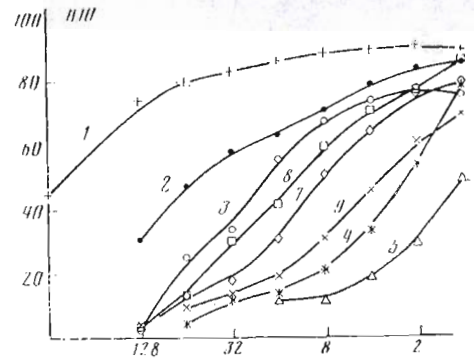
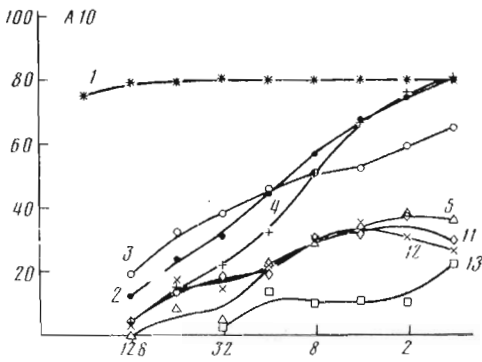
Гликозиды, олигосахариды и ПАА-конъюгаты, использовавшиеся в ингибиторном анализе и прямом связывании антител *

Формула соединения	Краткое обозначение
Моносахариды	
Fuc α 1-sp Fuc α 1-sp ¹ -ПАА	Fuc-sp Fuc-ПАА
Дисахариды	
Gal α 1-3Gal β 1-sp Gal α 1-3Gal β 1-sp ¹ -ПАА Gal α 1-3GalNAc α 1-sp Gal α 1-4GlcNAc β 1-sp Fuc α 1-2Gal β 1-sp Fuc α 1-2Gal β 1-sp ¹ -ПАА Fuc α 1-3Gal β 1-sp Fuc α 1-3GlcNAc β 1-sp Fuc α 1-4GlcNAc β 1-sp Fuc α 1-6GlcNAc	B _{di} B _{di} -ПАА T _{α,α} Gal α 4GlcNAc H _{di} H _{di} -ПАА Fuc α 3Gal Fuc α 3GlcNAc Fuc α 4GlcNAc Fuc α 6GlcNAc
Трисахариды	
Gal α 1-3 Gal β 1-sp Fuc α 1-2 Gal α 1-3 Gal β 1-sp ¹ -ПАА Fuc α 1-2 Gal α 1-3 Gal β 1-sp Gal α 1-2 Gal α 1-4Gal β 1-4Glc Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-sp Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-sp ¹ -ПАА Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc α 1-sp ¹ -ПАА Fuc β 1-2Gal β 1-3GlcNAc GalNAc α 1-3 Gal β 1-sp Fuc α 1-2 GalNAc α 1-3 Gal β 1-sp ¹ -ПАА Fuc α 1-2 Fuc α 1-4 GlcNAc β 1-sp Gal β 1-3 Fuc α 1-3 GlcNAc β 1-sp Gal β 1-4	B _{tri} B _{tri} -ПАА (Gal) ₂ Gal P ^k P ^l H _{tri} (1) H _{tri} (1)-ПАА H _{tri} (3)-ПАА Fuc β 2Gal β 3GlcNAc A _{tri} A _{tri} -ПАА Le ^a Le ^x
Тетрасахариды	
Gal α 1-3 Gal β 1-3GalNAc α 1-sp ¹ -ПАА Fuc α 1-2 Fuc α 1-2Gal β 1-3 GlcNAc β 1-sp ¹ -ПАА Fuc α 1-4	B _{tetr} (3)-ПАА Le ^b -ПАА

sp = OCH₂CH₂CH₂NHCOCF₃ для мономерных производных,
sp¹ = OCH₂CH₂CH₂— для полиакриламидных конъюгатов.

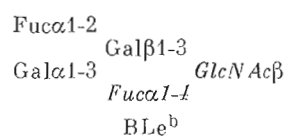
взаимодействие с B_{tri}-ПАА (30%) * было более сильным, чем с природными веществами В. Следует отметить отсутствие ингибирования дисахаридными производными Gal α 1-3Gal β 1-(исключение — МА А10) и Fuc α 1-

* Подстрочный индекс означает: di — дисахарид, tri — трисахарид, tetr — тетра-сахарид, nat — природное вещество из эритроцитов человека, sal — групповое вещество слоны; число в скобках — мольный % замещения ПАА слейсерированным олигосахаридом.



2Galβ1-фрагментами трисахаридной структуры V_{tri} , а также любыми вариантами и фрагментами антигена А.

Полной неожиданностью следует признать активность 8 из 10 антител по отношению к дисахаридам $Fuca1-4GlcNAc$ и $Fuca1-6GlcNAc$, не имеющим в первичной структуре ничего общего с V_{tri} (кроме α-фукозы, которая неактивна ни в виде $Fuca1-sp$, ни в полимерной форме $Fuca1-sp-ПAA$, ни даже в виде $Fuca1-2Galβ1-sp$). Можно было бы предположить, что изученные антитела направлены не к трисахариду В, а к более сложному антигену — пентасахариду VLe^b (так называемому дифукозильному варианту антигена В, внутренним фрагментом которого является дисахарид $Fuca1-4GlcNAc$ (выделен курсивом):



Однако ряд данных противоречит такому предположению: 1) реактивность изученных МА не зависит от Le-статуса доноров, т. е. от принадлежности эритроцитов к той или иной группе системы Le (данные не приведены);

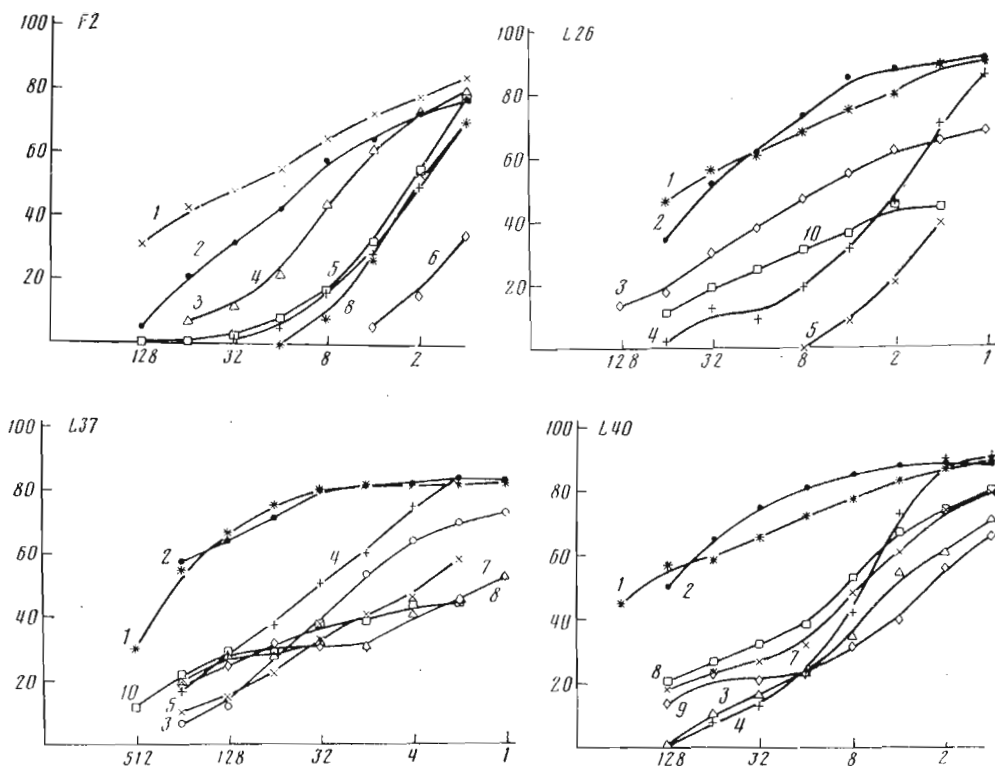


Рис. 1. Ингибирование синтетическими и природными веществами связывания (в ИФА) с природным группоспецифическим веществом B_{nat} моноклональных антител А10, Н10, G10, В11, В8, D2, F2, L26, L37, L40. По оси ординат приведено ингибирование в процентах. По оси абсцисс — разведение для ингибиторов при их начальной концентрации (кроме B_{sal}) 500 мкг/мл. Для B_{sal} начальная концентрация составляет: для А10—20, Н10, L26 — 10, В11 — 0,6, L37 — 0,3, F2 — 0,08, L40 — 0,04 мкг/мл. Ингибиторы — B_{tri} -ПАА (30%) (1), B_{nat} (2), B_{sal} (3), B_{tri} (4), B_{tri} -ПАА (5%) (5), $Fuc\alpha 3GlcNAc$ (6), $Fuc\alpha 4GlcNAc$ (7), $Fuc\alpha 6GlcNAc$ (8), H_{tri} (1) (9), B_{tet} (3)-ПАА (10), B_{di} -ПАА (11), P^k (12), $(Gal)_2Gal$ (13)

2) наблюдалось ингибирование антител не только изомером $Fuc\alpha 1-4GlcNAc$, но и $Fuc\alpha 1-6GlcNAc$; 3) отсутствие ингибирования олигосахаридами Le^a и Le^b (см. табл. 1), которые включают в себя фрагмент $Fuc\alpha 1-4GlcNAc$, но структурно более близки к BLe^b , чем дисахарид.

Таким образом, все изученные антитела взаимодействовали с В-трисахаридом. В то же время, несмотря на значительное сходство в эпитопной специфичности, наблюдались и некоторые индивидуальные особенности: антитела L26, L37 и наиболее интенсивно G10 ингибировались тетрасахаридом В типа 3 (который в эритроцитах пока не обнаружен), антитела Н10, G10 и L40 — трисахаридом Н типа 1, антитела В8 — всеми тремя изомерами дисахарида $Fuc\alpha 1-GlcNAc$, антитела А10 — дисахаридами $Gal\alpha 1-3Gal$ (B_{di}) и $Gal\alpha 1-4Gal$ (см. рис. 1, а также табл. 2, в которой суммированы данные по специфичности МА); взаимодействие МА с трисахаридом B_{tri} было значительно ниже, чем с полимерным конъюгатом B_{tri} -ПАА (30%). В то же время в одном случае (см. МА L26) низкопроцентный конъюгат B_{tri} -ПАА (5%) практически не ингибировал связывания. На основании этих данных было сделано предположение о существовании у некоторых из анти-В-антител чувствительности к топологии поливалентного антигена, что было изучено методом прямого связывания антител с ПАА-конъюгатами синтетических олигосахаридов на нитроцеллюлозных мембранах.

Суммарные данные по взаимодействию анти-В-МА с природными и синтетическими веществами в реакциях прямого связывания и ингибирования

МА	Преципитация Bsal	Ингибирование связывания в ИФА					Прямое связывание МА V _{tri} -ПАА-конъюгатами **	Совпадение кривых ингибирования природным веществом V _{nat} и синтетическим конъюгатом V _{tri} ПАА (30%)
		Bsal	V _{tri}	V _{tetr} (3)	FucClcNAc*	H _{tri} (4)		
A10	—	+	++++	—	—	—	30 > 25 и 35	Нет
H10	+	+++	++++	—	—	+	»	»
G10	+	+++	++++	+++	—	+	35 > 25 и 30	»
B11	+	+++	++++	—	—	+	30 > 25 и 35	»
B8	+	+++	++++	—	—	—	»	»
D2	+	?	++++	—	—	—	»	»
F2	+	+++	++++	—	—	—	»	»
L26	—	+	++++	+	—	—	»	Да
L37	—	+++	++++	+	+	—	н.о.	»
L40	+	+++	++++	—	+	+	30 > 25 и 35	»

* Дисахариды с 1 → 4- и 1 → 6-связями.

** Приведены относительные величины связывания для 25-, 30- и 35%-ных V_{tri}-ПАА-конъюгатов.

Прямое связывание МА с антигенами на нитроцеллюлозных мембранах

Так как все 10 анти-В-антител по-разному агглютинируют эритроциты разных подгрупп В, но сходны по эпитопной специфичности, мы предположили, что принципиальное их различие между собой может заключаться в чувствительности к эпитопной плотности гаптена. Поэтому 9 анти-В-МА (кроме МА L37, которые не связывались с сенсibilизированной мембраной) были изучены в реакции прямого связывания с природным и синтетическим антигенами — ПАА-конъюгатами с различной нагрузкой В-трисахаридом: 5, 10, 15, 20, 25, 30 и 35%.

Результаты прямого связывания антител с ПАА-конъюгатами (рис. 2) показывают, что для всех изученных в этой тест-системе МА, за исключением G10, максимальное связывание наблюдается при использовании 30%-ного конъюгата. Конъюгат с 35%-ной нагрузкой связывает антитела слабее, чем с 30%-ной. Эта закономерность наблюдается как для наиболее активно связывающихся МА (B8 и D2), так и для реагирующих значительно слабее (см. рис. 2 и табл. 2). Поскольку по достижении 35%-ной нагрузки трисахарида дальнейшего присоединения V_{tri}O(CH₂)₃NH₂ к активированному полимеру практически не происходит, достигнутая плотность «упаковки» гаптена в конъюгате, по-видимому, близка к максимальной. Сближенность гаптенных V_{tri}, может уменьшать их доступность для антигенсвязывающего участка антител и приводить, таким образом, к уменьшению связывания.

Прямое связывание МА с олигосахаридами, иммобилизованными на макропористом стекле

В процессе данной работы стали доступными предварительные данные по специфичности антител B8 и серии L в отношении синтетических олигосахаридов, иммобилизованных на жесткой силикатной матрице * (материалы Рабочего совещания [7], стр. 40, 46, 55, 57), причем эти данные не совпадали с нашими, полученными с применением других методов (см. ниже обсуждение МА B8). Поэтому мы также изучили прямое связывание

* Так называемые Синсорбы (Synsorbs; Chembiomed, Канада).

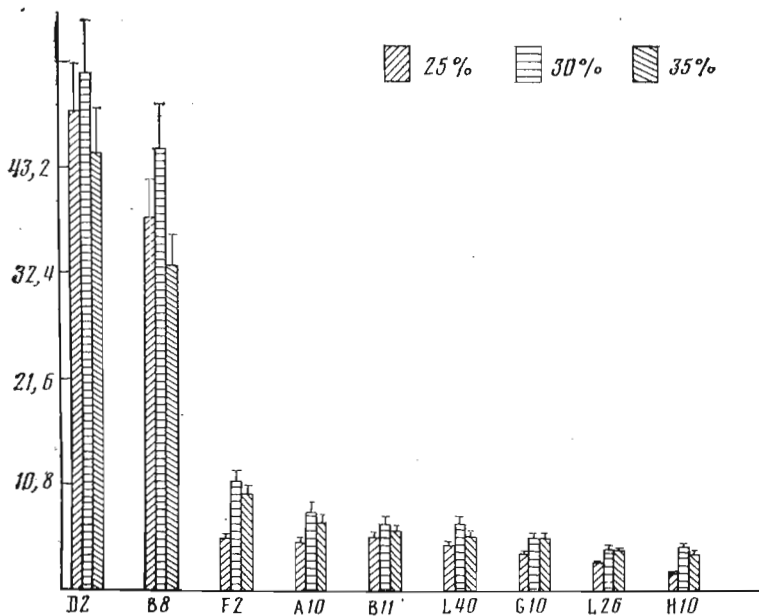


Рис. 2. Прямое связывание МА с V_{tri} -ПАА (25%), V_{tri} -ПАА (30%) и V_{tri} -ПАА (35%) на нитроцеллюлозных мембранах (в отн. ед., шкала линейная)

антител с аналогичными сорбентами. Последние представляют собой макропористое стекло (MG) с размерами пор 2000 Å, к которому через полиакриламид ковалентно присоединены синтетические олигосахариды [10, 11], в данном случае V_{di} и V_{tri} в количестве 10 и 2 мкмоль/г соответственно. Антитела инкубировали с сорбентами при 4° С в течение 3 ч, после чего снова определяли гемагглютинирующий титр. В первую очередь обращают на себя внимание данные (табл. 3) по сравнительной активности сорбентов MG- V_{di} и MG- V_{tri} : если с поликлональными анти-В-сыворотками эти два сорбента взаимодействовали практически одинаково [11], то с моноклональными антителами дисахаридный сорбент взаимодействовал значительно слабее трисахаридного, и это характерно для всех изученных МА. Все-таки, хотя и слабо, но дисахаридный сорбент связывал 6 из 10 МА, в то время как в реакции ингибирования связывания (рис. 1) V_{di} -ПАА был активен только в отношении МА А10. Сродство к обоим сорбентам показали антитела В8; наиболее избирательными в тест-системе оказались антитела F2; МА серии L не проявили сходства между собой (табл. 3).

Сравнение данных по взаимодействию анти-В-антител с синтетическими антигенами, эритроцитами и другими природными антигенами

Изученные анти-В-МА различаются по способности реагировать с эритроцитами, принадлежащими к фенотипам В, В₃, В_x и В_{weak} (в табл. 4 приведены характеристики пяти антител, наиболее интересных с точки зрения агглютинации слабых эритроцитов). Все 10 МА интенсивно агглютинируют эритроциты «сильной» подгруппы В, причем реакция агглютинации на плоскости начинается немедленно (авидность 0—1 с), а полностью завершается (интенсивность) через 15—45 с образованием одного (4 +) или нескольких (3+) агрегатов. С эритроцитами В₃ способны реагировать все изученные МА, однако авидность и интенсивность реакции агглютинации составляют соответственно 11—43 и 57—177 с. При этом гемагглютинирующая активность в отношении В₃ не коррелирует с титром МА в реакции гемагглютинации с эритроцитами «сильной» подгруппы В. С эритроцитами наиболее «слабых» подгрупп В_x и В_{weak} реагируют только антитела L26, L37 и L40 (авидность 15—167 с, интенсивность более 120 с).

Снижение титра МА сорбентами MG-B_{di} и MG-B_{tri}*

МА **	MG-B _{tri} , мг/мл			МА **	MG-B _{tri} , мг/мл		
	15	50	100		15	50	100
A10	4	0	1	D2	1	0	0
H10	3	0	1	F2	4	0	0
G10	3	0	1	L26	3	0	0
B11	3	0	1	L37	1	0	2
B8	3	1	2	L40	3(для 30 мг/мл)	0	0

* Приведено отношение $\log_2(\text{исх})/\log_2$ (после сорбции).

** Концентрация первого рабочего разведения (см. рис. 1).

Таблица 4

Серологические характеристики анти-В-МА *

Подгруппа эритроцитов										Титр МА с эритро- цитами В
В			В ₃		В _x		В _{weak}		МА	
AV	I		AV	I	AV	I	AV	I		
L26	0	33(4+)	н.о.	н.о.	13	60(3+)	15	>120(1+)		8192
L37	0	50(3-)	»	»	41	70(2+)	57	>120(1+)		256—512
L40	3	50(2-)	»	»	43	177(1+)	167	>120(1+)		256
D2	0	14(4+)	3	19(3+)	11	58(1+)	—	—		64—128
B8	0	13(4+)	6	31(2+)	21	57(1+)	—	—		512—2048

* В скобках приведена выраженность агглютинации по четырехбалльной системе: 4+(один агрегат), 3+(несколько крупных агрегатов), 2+(несколько агглютинатов среднего размера), 1+(много мелких агглютинатов наряду со свободными эритроцитами), н.о. — не определялись. AV — avidность, с; I — интенсивность, с.

Как видно из данных табл. 2 и 4, взаимодействие МА с эритроцитами В_x и В_{weak} не связано с их способностью преципитировать вещество В слюны лиц-секреторов (В_{sal}).

МА L26, L37 и L40 («лундовские»)

Внутри этой группы МА, дискриминирующих варианты В_x и В_{weak}, антитела L40 значительно уступают остальным по агглютинационным характеристикам. Интересно было сравнить особенности взаимодействия МА серии L с эритроцитами, с одной стороны, и с синтетическими антигенами — с другой.

В табл. 2 суммированы данные по ингибированию и прямому связыванию антител с синтетическими антигенами, а также преципитации вещества В слюны лиц-секреторов. Единственный параметр, по которому антитела серии L выделяются среди остальных, — это практически полное совпадение кривых ингибирования природным веществом В_{nat} и синтетическим В_{tri}-ПАА (30%) (см. рис. 1) в широком интервале их концентраций, т. е. антитела L26, L37 и L40 одинаково узнают природное вещество из эритроцитов В и синтетический конъюгат с определенной эпитопной плотностью В-гаптена. Мало вероятно, что обнаруженное совпадение отражает реальное физическое сходство двух гликоконъюгатов, так как оба, и природный, и синтетический, довольно гетерогенны; тем не менее совпадение кривых может стать полезным критерием при отборе новых анти-В-МА, хорошо агглютинирующих наиболее «слабые» варианты эритроцитов В.

Из трех «лундовских» наиболее интересны, как агглютинирующие эритроциты В_x и В_{weak}, антитела L26 и L37 (наши данные, а также [7]), которые выделяются из всех изученных МА способностью взаимодействовать с тетрасахаридом В типа 3 (с В_{tetr} (3)) реагируют также МА G10, которые

обсуждаются ниже, см. табл. 2 и рис. 1). Этим результатам можно дать два объяснения: 1) на эритроцитах «слабых» подгрупп В действительно экспрессируется какое-то количество тетрасахаридных структур V_{tetr} (3). Хотя существует «запрет» на биосинтез структур типа 3 в составе гликолипидов [12], на гликопротеинах тетрасахарид V_{tetr} (3), присоединенный непосредственно к Seg или Thg , встречаться может (правда, до сих пор в составе гликопротеинов эритроцитов человека такие фрагменты не найдены); 2) антитела L26 и L37 одинаково хорошо узнают трисахаридную детерминанту, независимо от того, к какому типу цепи она присоединена; такая специфичность антител требует минимального сближения с гликоконъюгатами поверхности эритроцитов, что, по-видимому, позволяет им взаимодействовать даже с частично экранированными «сбоку» антигенами.

МА G10

Эти МА выделяются тем, что взаимодействуют с V_{tetr} (3)-ПАА, причем сильнее, чем L26 и L37 (см. табл. 2). Кроме того, в отличие от L26 и L37 они преципитируют групповое вещество В из слюны, т. е. взаимодействуют с цепями В типа 1. Таким образом, МА G10 узнают углеводные структуры типов 1 (слюна), 2 (эритроциты) и 3 (синтетический тетрасахарид); из 9 изученных только антитела G10 максимально связываются с конъюгатом V_{tri} -ПАА (35%) в ряду 25—30—35%. Все перечисленные данные говорят о том, что МА G10 узнают трисахаридный фрагмент В, причем, возможно, не в виде единичного гаптена, а в виде кластера гаптен. Нечувствительность МА G10 к типу цепи не дает им преимуществ в качестве агглютинирующих эритроциты антител, что еще раз приводит к выводу о большей значимости пространственных факторов мультивалентного связывания, чем эпитопной специфичности как таковой.

МА B8

Антитела B8 были представлены (Е. И. Дерюгина и др.) на Второй международной симпозиум в Лунде [7] и изучены в нескольких лабораториях как в реакции геагглютинации, так и при помощи Синсорбов — синтетических олигосахаридов, иммобилизованных на твердом носителе. Эти МА считаются одними из антител с максимально широкой В-специфичностью ([13], зашифрованы как МА 028). Так, показано [13], что МА B8 сорбируются на Синсорбах *всех* типов цепей В (типы 1—3, а также дифукозильные), на Синсорбе P^1 и даже моносахаридном (α -Gal). Это находится в противоречии с нашими результатами по ингибированию (рис. 1), согласно которым ни V_{tetr} (3), ни трисахарид P^1 , ни α -Gal-содержащие дисахариды (в том числе и V_{di}) не являются ингибиторами связывания антител B8. Поэтому в данной работе и были проведены опыты прямого связывания МА с двумя сорбентами — $MG-V_{tri}$ и $MG-V_{di}$. В данной тест-системе МА B8 действительно показали наиболее широкую специфичность (см. табл. 3), достаточно хорошо связываясь с дисахаридным сорбентом. Таким образом, информация, получаемая в реакциях ингибирования и прямого связывания антител, может принципиально различаться.

Сумма полученных данных (см. табл. 2 и 4) позволяет предположить существование структурных различий в углеводных детерминантах вариантов эритроцитов V , V_3 , V_x и $V_{век}$.

Сравнение эпитопной специфичности, а также чувствительности к эпитопной плотности гаптена для данных 10 антител, к сожалению, не позволило сделать каких-либо однозначных выводов относительно характера молекулярных различий между сильными и слабыми вариантами В-эритроцитов. Природу таких различий, по-видимому, можно будет изучать прямыми классическими методами структурной химии углеводов.

Экспериментальная часть

Использовались следующие реагенты: желатин (Sigma), Твин-20 (Sigma), конъюгат антител против иммуноглобулинов мыши (IgM) с пероксидазой хрена предприятия «Кайу» (Эстония); планшеты из полистирола NUNC-Immuno-Plate-I (Nunc, Дания).

Ингибиторный анализ. Результаты ИФА измеряли на приборе Multiskan MK II (Titertek). 96-Луночные планшеты сенсibilизировали групповым веществом (суммарная гликопротеиновая фракция) из эритроцитов донора группы крови В (10 мкг/мл, карбонатный буферный раствор с рН 9,6, по 100 мкл в лунку) в течение 2 ч при 37° С, затем 15 ч при 4° С, отмывали буферным раствором (PBS, рН 7,4), содержащим 0,05% Твин-20, обрабатывали 1 ч при 37° С 0,1%-ным желатином в PBS. Антитела в объеме 100 мкл (в оптимальной, предварительно подобранной концентрации) смешивали в лунках планшетов с сериями двукратных разведений ингибиторов (начальная концентрация 0,5 мг/мл) и инкубировали 2 ч при 37° С. После отмывки связанные МА измеряли при помощи конъюгата пероксидаза—анти-IgM_{mouse}, разведенного в PBS в 500 раз (100 мкл в лунку): выдерживали 1 ч при 20° С, промывали PBS, проявляли в субстратном растворе перекиси водорода (0,25%) и *o*-фенилендиамина (0,1%). Каждую концентрацию ингибитора дублировали в соседних лунках планшета, каждый эксперимент по ингибированию повторяли дважды, а в случае расхождения более 10% — трижды.

Связывание на нитроцеллюлозной мембране. Использовались нитроцеллюлозные мембраны с размером пор 45 мкм (Schleicher und Schüll, ФРГ). На мембрану наносили по 10 мкл ПАА-конъюгата (начальная концентрация 1 мг/мл, затем в последовательных двойных разведениях), высушивали при 37° С в течение 30 мин; мембрану выдерживали 1 ч при 20° С в растворе МА гемагглютинирующего титра 1 : 64 на ротационном шейкере, промывали PBS, содержащим 0,3% Твин-20 (4 × 5 мин). После отмывки связывание МА измеряли при помощи конъюгата пероксидаза—анти-IgM_{mouse}, разведенного в 500 раз тем же буфером: выдерживали 2 ч при 20° С, промывали по приведенной выше схеме, проявляли в субстратном растворе 0,25% перекиси водорода и 0,05% 4-хлор-1-нафтола в фосфатно-солевом буфере. Время экспозиции 30 мин. Интегральную интенсивность пятен измеряли на лазерном денситометре Gel Scan XL (LKB, Швеция).

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

Антигены и олигосахариды. Природное групповое вещество В_{nat} представляет собой суммарную белок-гликопротеиновую фракцию телей эритроцитов донора группы крови В (фирма ТТМ, Москва). Вещество В_{sal} получали, выдерживая слюну донора группы крови В 10 мин при 100° С, после чего хранили при -50° С. Синтетические олигосахариды Р¹, Р^k и Fucα6GlcNAc использовали в свободном (неспейсерированном) виде, остальные олигосахариды (табл. 1) — в виде гликозидов спейсера (sp) —OCH₂CH₂CH₂NHCOF₃ [8]. Синтез большинства соединений (табл. 1) опубликован [8—10] или будет опубликован в ближайшее время.

Водорастворимые ПАА-конъюгаты [9] представляют собой полиакриламид средней степени полимеризации около 1000, часть амидных групп которого замещена на гликозил-OCH₂CH₂CH₂.

Синтез ПАА-конъюгатов. К раствору β-(3-аминопропил)гликозида трисахарида В в DMF прибавляли раствор поли (4-нитрофенилакрилата) в количествах, соответствующих заданному мольному содержанию трисахарида (вплоть до 35 мол. % конденсация проходит с количественным выходом), затем избыточные нитрофенильные группы полимера превращали в амидные действием 25% водного аммиака. Полученные таким образом растворы без какой-либо очистки разбавляли буферным раствором и наносили на нитроцеллюлозные мембраны.

Сорбенты MG-B_{di} и MG-B_{tri} получали по методике [10]. Исходное активированное макропористое стекло любезно предоставлено А. Е. Ивановым (ИБХ АН СССР). Сорбент помещали в пробирку с антителами (соотношение см. в табл. 3) и выдерживали 1 ч при 20° С, периодически вручную перемешивая, после чего жидкую фазу декантировали и измеряли гемагглютинационный титр. Эритроциты В_x отнесены к данному фенотипу по их смешанной медленной агглютинации поликлональной изоиммунной анти-В-сывороткой, а также по наличию в сыворотке крови донора слабых

экстраагглютининов анти-B в титре 1 : 2—1 : 4. Эритроциты B_{weak} были получены с международного симпозиума [7].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Race R. R., Sanger R. Blood Groups in Man. Oxford: Blackwell Scientific. 1975. P. 8—91.
2. Дерюгина Е. И. // Успехи соврем. биологии. 1990. Т. 109. Вып. 1. С. 3—20.
3. Clausen H., Watanabe K., Kannagi R., Lavery S. B., Nudelman E., Arao-Tomono Y., Nakomori S. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1984. V. 124. P. 523—529.
4. Lubenko A., Ivanyi J. // Vox Sang. 1986. V. 51. № 1. P. 136—142.
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. С. 23—29.
6. Дерюгина Е. И., Дризе Н. И., Леменева Л. Н., Удалов Г. А., Чертков И. Л. // Биотехнология. 1988. Т. 4. С. 108—113.
7. Second International Workshop and Symposium on Monoclonal Antibodies Against Human Red Blood Cells and Related Antigens. Proceedings. 1990. Lund. Sweden.
8. Bovin N. V., Vyramova N. E., Zemlyanukhina T. V., Korchagina E. Yu. // Eurocarb V. 1989. Abstracts. P. C—72.
9. Землянухина Т. В., Бовин Н. В. // Биооргани. химия, 1990. Т. 16. № 8. С. 1096—1104.
10. Бовин Н. В., Землянухина Т. В., Чагашвили Ц. Н., Хорлин А. Я. // Химия природ. соединений. 1988. № 6. С. 777—785.
11. Чагашвили Ц. Н., Зотиков Е. А., Бовин Н. В., Корчагина Е. Ю. // Гематология и трансфузиология. 1989. № 8. С. 56—58.
12. Clausen H., Lavery S. B., Dabelsteen E., Nakomori S. // Transplant. Proc. 1987. V. 19. № 6. P. 4408—4412.
13. Kornprobst M., Dalix A. M., Oriol R. // Proceedings of the Second International Workshop and Symposium on Monoclonal Antibodies Against Human Red Blood Cells and Related Antigens. 1990. Lund. Sweden. P. 40.

Поступила в редакцию
18.II.1991

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

EPITOPE SPECIFICITY OF HEMAGGLUTINATING MONOCLONAL ANTI-B ANTIBODIES

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

Fine epitope specificity of ten monoclonal antibodies (MA) agglutinating red blood cells B was studied. Three methods were used: 1) inhibition of MA binding to natural antigen by synthetic oligosaccharides (OS) and their polyacrylamide conjugates, 2) direct MA binding to a series of synthetic OS-polyacrylamide conjugates differing in carbohydrate epitope density, 3) direct MA binding to the affinity sorbents. It is shown that all antibodies studied prefer trisaccharide B determinant Gal α 1-3(Fuc α 1-2) Gal independently of their ability to discriminate serological subgroups of B erythrocytes (B, B_{weak}, B₃). The correlation of the MAs epitope specificity with their ability to agglutinate red blood cells B subgroups is discussed. Of an interest is that MAs which are able to agglutinate any B subgroups also bind the synthetic tetrasaccharide Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc, a B type 3 determinant.