



УДК 577.152.344.042 : 577.112.083.3

© 1994 О. Г. Оглоблина, Р. Беккерт,  
Л. А. Белова, К. Д. Палванова

## МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К ТРИПСИНСВЯЗЫВАЮЩЕМУ ДОМЕНУ ИНГИБИТОРА ТРИПСИНА ИЗ МОЧИ ЧЕЛОВЕКА

*Кардиологический научный центр РАМН, Москва*

Ключевые слова: трипсин, ингибитор из мочи человека, антитела моноклональные, ИФА, медицинское применение.

Гибридизацией клеток мышинной миеломы P<sub>3</sub>O<sub>1</sub> со спленоцитами иммунизированной мыши BALB/c получены три вида моноклональных антител (МА), M2, B6 и P1 (тип IgG<sub>1</sub>), к мочевому ингибитору трипсина (МТИ), гликопротеиду с противовоспалительными свойствами. Титрованием связанного с твердой фазой МТИ конъюгатами M2, B6 и P1 с пероксидазой хрена в присутствии трипсинсвязывающего домена МТИ показано, что наибольшим сродством к этому домену обладают M2. Константа диссоциации комплекса МТИ с M2 составляет 10<sup>-10</sup> М. Предложен метод определения концентрации МТИ в моче человека путем прямого конкурентного иммуноферментного анализа с использованием конъюгата антител M2 с пероксидазой хрена, который может быть полезен для ранней диагностики нарушения функции почек.

Ингибитор трипсина, обнаруживаемый в моче человека (МТИ), представляет собой кислотостабильный ингибитор трипсина плазмы крови, экскретируемый почками при патологических условиях. Ингибитор синтезируется в печени, и его биосинтез ускоряется при острых воспалительных процессах, сепсисе, почечной недостаточности и беременности [1]. Наиболее высокие концентрации МТИ в моче обнаружены у больных со злокачественными новообразованиями в стадии метастазирования [2—6]. Сравнение первичных структур пептидной части МТИ (M 44 кДа) и интер- $\alpha$ -ингибитора трипсина плазмы крови человека (ИТИ, M 180 кДа) показало, что полная аминокислотная последовательность МТИ является фрагментом легкой цепи ИТИ [1, 7]. Предполагают, что ИТИ — депо-форма МТИ, и при острых воспалительных процессах, сопровождающихся активацией плазменных протеолитических систем, ИТИ становится источником МТИ в плазме крови, а затем и в моче. Молекула МТИ состоит из двух гомологичных доменов, первичная структура которых сходна со структурой основного ингибитора протеиназ типа Кунитца из крупного рогатого скота. N-Концевой домен связывает химотрипсиноподобные протеиназы, а другой домен — трипсиноподобные протеиназы и, возможно, эластазу гранулоцитов [1]. МТИ, по-видимому, идентичен

---

Сокращения: МТИ — ингибитор трипсина из мочи; ТД-МТИ — трипсинсодержащий домен МТИ; ИТИ — интер- $\alpha$ -ингибитор трипсина; ВИЧ — вирус иммунодефицита человека; ИФА — иммуноферментный анализ; МА — моноклональные антитела; МА-РХ — МА, конъюгированные с пероксидазой хрена; BSA — бычий сывороточный альбумин.

фактору роста эндотелиальных клеток человека, известному под названием ECGF 2b [8], и EDC1-белку, обнаруживаемому у больных раком [5, 6]. Недавно появилось сообщение об анти-ВИЧ-активности МТИ [9].

В биологических жидкостях МТИ идентифицируют по его антитриптической активности, а также иммуноэлектрофоретическим или иммуноферментным анализом (ИФА) на основе поликлональных антител к МТИ [10—14]. В данной работе получены моноклональные антитела (МА) к МТИ с высоким сродством к его трипсинсвязывающему домену и предложен метод ИФА содержания МТИ в моче [15]. Для иммунизации мышей в качестве антигена использовали препарат МТИ, для которого характерен полиморфизм по молекулярной массе, обусловленный наличием трех функционально идентичных форм МТИ с молекулярными массами 14, 22 и 44 кДа, различающихся размером нефункционального гликопептида, протеолизованного в разной степени [11]. Молекулярная масса препарата была рассчитана с учетом содержания в нем каждой формы и составила 28,7 кДа;  $A_{280}^{0.1\%} = 0,62$ .

В результате гибридизации спленоцитов иммунизированной МТИ мыши линии BALB/c с клетками мышины миеломы P<sub>3</sub>O<sub>1</sub> получили гибридные клоны M2, P1 и B6, секретирующие антитела против МТИ. Препаративные количества МА (IgG-иммуноглобулины мыши) были наработаны выращиванием гибридных клеток в мышинном асците. Антитела очищали осаждением сульфатом натрия и анонообменной хроматографией.

ИФА содержания МТИ в моче человека возможен при наличии МА с высоким сродством к антигену. МА M2 проявили максимальное сродство к МТИ: в непрямом твердофазном ИФА концентрация, необходимая для 50% связывания сорбированного МТИ, оказалась для M2 ниже, чем для B6 и P1, в 3 и 7 раз соответственно. Аналогичные результаты получены в прямом твердофазном ИФА, где использовались конъюгаты исследуемых АТ с пероксидазой хрена (далее — пероксидаза, РХ) (рис. 1). Величина  $K_d$  для комплекса МТИ с M2 имела порядок  $10^{-10}$ .

В связи с тем что *in vivo* молекула МТИ, по-видимому, деградируется эндогенными протеиназами вплоть до образования трипсинсвязывающего домена (ТД-МТИ), чрезвычайно устойчивого к протеолизу и сохраняющего свойство ингибировать трипсин [16], мы считаем, что в тест-системе для определения МТИ в моче необходимо использовать МА, имеющие сродство к этому домену (ТД-МТИ), результаты иммуноферментного определения которого должны соответствовать реальной концентрации МТИ в биологической жидкости.

Мы установили, что среди конъюгированных с пероксидазой МА (M2, B6 и P1) наивысшее сродство к ТД-МТИ имеет конъюгат M2-РХ, причем концентрации МТИ и ТД-МТИ в жидкой фазе, соответствующие полумаксимальному связыванию M2-РХ с твердофазным МТИ, близки (рис. 2а, б).

Иммуноблоттинг показал, что при SDS-электрофорезе образца МТИ, обработанного 2-меркаптоэтанолом, МТИ не детектировался с помощью M2, тогда как поликлональная мышинная антисыворотка к МТИ давала положительную реакцию. Из этих результатов следует, что M2 направлены против конформационного (не структурного) эпитопа МТИ.

Так как структура МТИ включена в структуру плазменного ИТИ, нами была изучена также реакция между конъюгатом M2-РХ и ИТИ. Обнаружена конкуренция ИТИ в жидкой фазе и твердофазного МТИ за связывание с M2-РХ (рис. 2в). Этот результат является дополнительным подтверждением структурного родства МТИ и ИТИ и показывает возможность идентификации с помощью M2 не только МТИ, но и его депо-формы ИТИ. Последнее существенно для оценки возможности тестирования МТИ в плазме крови, где ИТИ присутствует в сравнительно высокой концентрации (уровень для здоровых людей 3,3 мМ) и не важно для тестирования МТИ в моче, в которой ИТИ не обнаруживают.

Методом ИФА обнаружено достоверное ( $P < 0,05$ ) увеличение концентрации

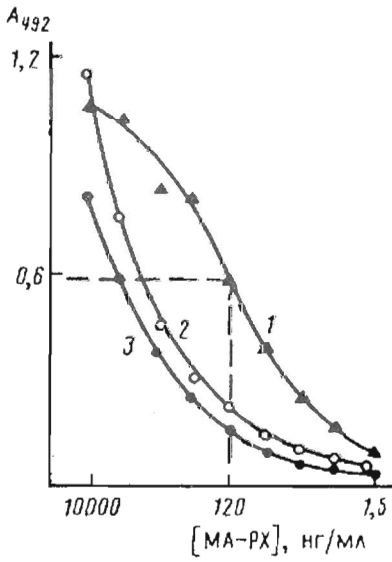


Рис. 1

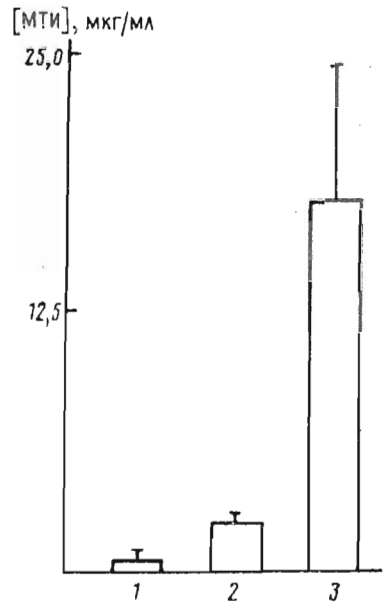


Рис. 3

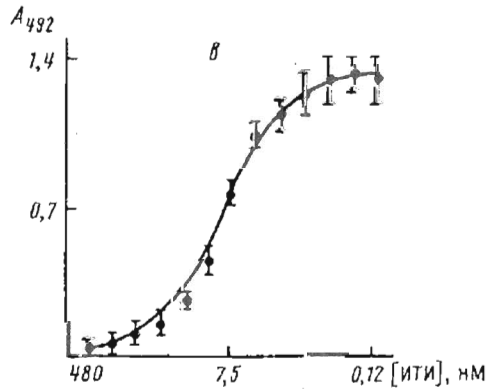
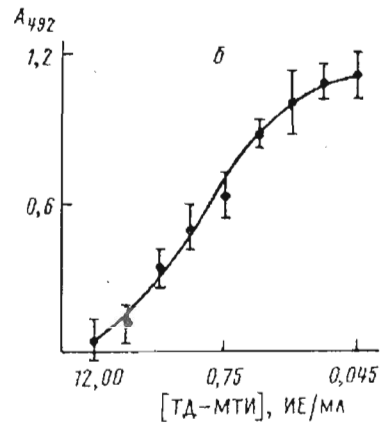
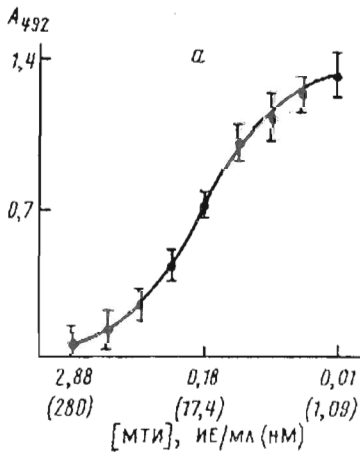


Рис. 2

МТИ в моче больных нефритами с достаточной и недостаточной функцией почек в 8—9 раз ( $P < 0,01$ ) и 70—80 раз ( $P < 0,05$ ) по сравнению с нормальным уровнем соответственно (рис. 3). Различия в уровнях МТИ в группах больных с достаточной и недостаточной функцией почек также достоверны ( $P < 0,01$ ). Полученные результаты согласуются с нашими прежними данными по спектрофотометрическому определению содержания МТИ в моче больных этой категории [17]. Характерной чертой спектрофотометрической методики является подкисление белкового концентрата мочи, которое способствует как диссоциации комплексов протеиназа—МТИ, так и инактивации лабильных ингибиторов и их осаждению вместе с другими белками. При этом происходит соосаждение МТИ [11], что приводит к занижению его концентрации. В результате величины уровней МТИ, обнаруживаемые ИФА, примерно в 2 раза выше величин, полученных спектрофотометрическим методом. Таким образом, метод ИФА, разработанный в данном исследовании, более подходит для определения реального уровня МТИ в моче, чем спектрофотометрический. Косвенным доказательством возможности определения МТИ как в свободной, так и в комплексированной с протеиназами форме методом ИФА является наличие положительной корреляции ( $r = 0,89$ ) между уровнями МТИ, обнаруженными ИФА (без обработки образцов кислотой, ведущей к диссоциации комплексов МТИ с протеиназами) и спектрофотометрическим методом, включающим обработку образцов кислотой.

Таким образом, одним из возможных применений М2, проявляющих высокое сродство к ТД-МТИ, может быть ИФА его содержания в моче с целью раннего выявления нарушения функции почек.

### Экспериментальная часть

В работе использовали препараты белков: пероксидаза завода биопрепаратов (Олайне, Латвия); ИТИ, любезно предоставленный доктором Н. Хаупт (Behringwerke AG, Германия); МТИ (95—97% чистоты по титрованию трипсином), выделенный из мочи здоровых людей методом с использованием химотрипсин-сефарозы [18]; ТД-МТИ, полученный как описано в [16], полный и неполный адьюванты Фрейнда, среды RPMI 1640 и DMEM, плашки для ИФА Titertek (Flow Laboratories, США).

*Клеточные линии.* Клетки миеломы линии X.63 Ag 8.653, клон P<sub>3</sub>O<sub>1</sub>, любезно предоставленный доктором Р. Аколле (Ludwig Cancer Institute, Швейцария), перед гибридизацией выдерживали в среде RPMI 1640 с добавлением эмбриональной сыворотки теленка, 100 ед/мл стрептомицина и 300 мкг/мл L-глутамина (Gibco, США). Клетки гибридомы выдерживали в среде RPMI 1640 с добавлением 20% эмбриональной сыворотки.

*Иммунизация.* Мышам линии BALB/c делали внутрибрюшинную инъекцию 100 мкг МТИ в полном адьюванте Фрейнда, повторные инъекции по 100 мкг МТИ в неполном адьюванте Фрейнда делали на 7-й и 14-й день. На 21, 22 и 23-й дни вводили дозу в 100 мкг МТИ без адьюванта. Одну из мышей забивали на 24-й день после первой инъекции [19].

*Гибридизация и клонирование.* Клетки селезенки ( $9 \cdot 10^7$ ) иммунизированной мыши гибридизовали с несекретирующими клетками ( $3 \cdot 10^7$ ) мышинной миеломы линии X.63 Ag 8.653, клон P<sub>3</sub>O<sub>1</sub>, методом, описанным в работе [20], в 0,8 мл 50% (в/о) полиэтиленгликоля 3350 (Sigma, США), среда DMEM, pH 8,0. По-

Рис. 1. Связывание антител М2 (1), В6 (2) и Р1 (3), конъюгированных с пероксидазой хрена, с МТИ, сорбированным на твердой фазе

Рис. 2. Реакция конъюгата М2-РХ с МТИ (а), ТД-МТИ (б) и ИТИ (в) в жидкой фазе

Рис. 3. Концентрация МТИ в моче здоровых людей (1,  $n = 17$ ), больных нефритами с достаточной (2,  $n = 15$ ) и недостаточной (3,  $n = 9$ ) функцией почек по данным прямого конкурентного ИФА с использованием М2

зитивные гибридомы клонировали методом ограниченных разведений, после чего гибридные клетки выращивали в брюшной полости мышей в асцитной жидкости. Антитела выделяли осаждением  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и градиентной анионообменной хроматографией на DEAE-Toyopearl 650M (ToyoSoda, Япония) при pH 6,8 в градиенте  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (10—160 мМ), переводили в 0,1 М боратный буфер, pH 8,0, и хранили при  $-70^\circ\text{C}$ .

Изотип антител определяли методом Ухтерлони, используя коммерческий набор кроличьих антимышиных  $\text{IgG}_1$ ,  $\text{IgG}_{2a}$ ,  $\text{IgG}_{2b}$ ,  $\text{IgG}_3$ ,  $\text{IgM}$ ,  $\text{IgA}$  (IGN, США).

Непрямой (сэндвичевый) ИФА использовали для первичного тестирования продукции антител растущими гибридными клетками. На плашках для ИФА адсорбировали антиген (МТИ, 1 мкг в лунке) в 0,02 М карбонатно-бикарбонатном буфере, pH 9,6, в течение ночи при  $4^\circ\text{C}$ , затем для предотвращения неспецифического связывания белков плашку обрабатывали 1% BSA в 0,15 М NaCl, 10 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,4. Антитела, содержащиеся в культуральной среде, связывались с антигеном и проявлялись конъюгатом кроличьих антимышиных антител с пероксидазой с последующей инкубацией с субстратом — о-фенилендиамином и  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sigma, США) и измерением оптического поглощения при 492 нм.

Получение конъюгатов МА с пероксидазой проводили по методу, описанному в работе [21]. МА-РХ хранили в 50% глицерине с 0,5% BSA при  $-20^\circ\text{C}$ .

Константы диссоциации ( $K_d$ ) комплексов МТИ с  $^{125}\text{I}$ МА рассчитывали по методу [22], используя ИФА.

Прямой конкурентный ИФА применяли для определения МТИ, ТД-МТИ, ИТИ и содержания МТИ в образцах мочи. Различные концентрации тестируемых веществ или образцов белковых концентратов мочи инкубировали в лунках плашки для ИФА, покрытых адсорбированным МТИ (1 мкг в лунке), с раствором МА-РХ постоянной концентрации. Комплексы МА-РХ-антиген тестировали с помощью о-фенилендиамина и  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Иммуоблоттинг проводили в соответствии с инструкцией «Bio-Rad Immuno-Blot Goat Anti-Mouse (GAM) Horseradish Peroxide (HPR) Conjugate Instruction Manual». Препарат антигена (МТИ) подвергали электрофорезу в 10% SDS в восстанавливающих условиях в вертикальных гелях [23] с последующим трансблоттингом на нитроцеллюлозу BA85 (Schleicher und Schüll, Германия) [24]. Блоты выдерживали в 3% желатине 1 ч при  $25^\circ\text{C}$ , после чего инкубировали с М2 или мышинными антителами против *Trichinella spiralis*,  $\text{IgG}_1$ -изотипа, любезно предоставленными Т. Н. Власик (КНЦ РАМН, Москва) (негативный контроль), или с поликлональной антисывороткой иммунизированной МТИ мыши (позитивный контроль) при  $4^\circ\text{C}$  в течение ночи. После отмывки первое антитело, связанное с антигеном, проявляли козлиной антисывороткой к иммуноглобулинам мыши, меченной пероксидазой с использованием 2-бром-1-нафтола (Sigma, США).

Группы больных. Образцы мочи забирали от 17 здоровых доноров, 15 больных с заболеваниями почек без нарушения функции (10 с гломерулонефритом, 5 с пиелонефритом) и 9 больных с заболеваниями почек с нарушением функции (4 с гломерулонефритом, 5 с пиелонефритом).

Приготовление белковых концентратов мочи. 14 мл охлажденного ацетона прибавляли к 7 мл утренней мочи не позднее, чем через 2 ч от момента взятия образца, смесь выдерживали 2 ч при  $4^\circ\text{C}$ . Белковый осадок растворяли в 3,5 мл 0,05 М трис-НСI-буфера, pH 7,8, и хранили в виде аликвот по 1 мл при  $-20^\circ\text{C}$ .

Анализ белковых концентратов мочи. Концентрацию МТИ в белковых концентратах мочи измеряли прямым конкурентным ИФА по калибровочной кривой, построенной по высокоочищенному препарату МТИ с использованием метода двукратных последовательных разведений: 0,31, 0,62, 1,25, 2,5, 5,0 и 10,0 мкг/мл. Линейный участок калибровочной кривой соответствовал интервалу концентраций МТИ в моче здоровых людей и больных с почечной недостаточностью. Плашки с адсорбированным МТИ обрабатывали 10 мМ фосфатным буфером, pH 7,2—7,4, содержащим 1% BSA и 0,15 М NaCl для предотвращения неспецифического

связывания белков. Все разведения проводили в том же буфере, но в присутствии 0,05% Tween 20.

Антитриптическую активность белковых концентратов мочи измеряли после обработки 1 мл образца 60 мкл 56%  $\text{HClO}_4$  (1 ч,  $80^\circ\text{C}$ ), после охлаждения до  $20^\circ\text{C}$  образец центрифугировали (1000g, 15 мин). Супернатант нейтрализовали 5 н.  $\text{NaOH}$  и измеряли активность МТИ модифицированным методом [25]. В качестве субстрата использовали этиловый эфир *N*-бензоил-*L*-аргинина,  $[\text{S}]_0 = 7 \cdot 10^{-4}$  М, 0,05 М трис- $\text{HCl}$ -буфер, pH 8,0,  $15^\circ\text{C}$ .

Концентрацию белка измеряли методом Бредфорд [26], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gebhard W., Hochstrasser K.//Proteinase Inhibitors/Eds Barrett A., Salvesen G. Amsterdam: Elsevier, 1986. P. 389—401.
2. Lehtovirta P., Turpeinen U., Stenman U.//Gynecol. Oncol. 1990. V. 38. P. 110—113.
3. Okumichi T.//Med. J. Hiroshima. Univ. 1985. V. 33. P. 1—16.
4. Nishino N.//J. Jap. Soc. Cancer Ther. 1990. V. 25. P. 603—612.
5. Chawla R., Lawson D., Richmond A., Rudman D.//Cancer Res. 1980. V. 40. P. 4187—4191.
6. Okumichi T., Masayuki K., Takasugi S., Toki N., Esaki H.//Cancer Res. 1984. V. 44. P. 2011—2015.
7. Pratt C., Pizzo S.//Arch. Biochem. and Biophys. 1986. V. 248. P. 587—596.
8. McKeehan W., Sakagami Y., Hoshi H., McKeehan K.//J. Biol. Chem. 1986. V. 12. P. 5378—5383.
9. Hattori T., Koito A., Takatsuki K., Kido H., Katunuma N.//FEBS Lett. 1989. V. 248. P. 48—52.
10. Franc C., Pedersen J.//Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1983. V. 43. P. 151—155.
11. Оглоблина О. Г., Полянцева Л. Р., Пасхина Т. С.//Вопр. мед. химии. 1984. Т. 30. № 2. С. 104—108.
12. Kuwagima S., Matsui T., Kitahashi S., Kishida T., Noda T., Isumi Y., Naka K., Okuda K.//Clin. Biochem. 1990. V. 23. P. 167—171.
13. Sakakibara K., Urano T., Takada Y., Takada A.//Thrombos. Res. 1989. V. 56. P. 239—249.
14. Odum L., Hansen-Nord G., Ryrjalsen I.//Clin. chim. acta. 1987. V. 162. P. 189—198.
15. Оглоблина О. Г., Беккерт Р., Белова Л. А., Палванова К. Д.//III Симп. «Химия протеолитических ферментов». Тезисы докладов и стендовых сообщений. М.: 1993. С. 33.
16. Hochstrasser K., Wachter E.//Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1979. V. 360. P. 1285—1296.
17. Парфенкова Г. А., Оглоблина О. Г., Ситина В. К.//Бюл. Всесоюз. кардиол. научн. центра АМН СССР. 1988. № 1. С. 43—46.
18. Оглоблина О. Г., Белова Л. А., Малахов В. Н.//Вопр. мед. химии. 1987. Т. 33. № 4. С. 119—124.
19. Cianfriglia N., Armellini D., Massone A., Mariami M.//Hybridoma. 1983. V. 2. P. 451—457.
20. Koehler G., Milstein C.//Nature. 1975. V. 256. P. 495—498.
21. Nakane P., Kawaoi A.//J. Histochem. Cytochem. 1974. V. 22. P. 1084—1088.
22. Friguet B., Chaffotte A., Djavadi-Chaniance L., Goldberg M.//J. Immunol. Meth. 1985. V. 71. P. 305—319.
23. Laemmli U.//Nature. 1970. V. 227. P. 680—685.
24. Towbin H., Staehlin T., Gordon J.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 4350—4354.
25. Schwert G., Takenaka Y.//Biochem. et biophys. acta. 1955. V. 16. P. 570—575.
26. Bradford M.//Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248—254.

Поступила в редакцию  
15.VI.1993

*O. G. Ogloblina, R. Beckert, L. A. Belova, K. D. Palvanova*

**MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST TRYPSIN-BINDING DOMAIN  
OF HUMAN URINARY TRYPSIN INHIBITOR**

*National Cardiology Research Centre, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow*

Three MAb M2, B6, P1 (IgG<sub>1</sub> type) against human urinary trypsin inhibitor (UTI), a glycoprotein with antiinflammatory properties, have been produced by hybridization of mouse mueloma cells P<sub>3</sub>O<sub>1</sub> with spleen cells of immunized mice BALB/c. Competitive ELISA-examination of the peroxidase conjugates of M2, B6, and P1 MAb in the presence of the trypsin binding domain shows the M2 antibody to possess the highest affinity for this domain. On the basis of the MAb M2, a competitive ELISA of UTI concentration in urine is proposed. ELISA-detectable changes in the UTI content of urine from patients with nephritis without renal failure can be considered as an early index of renal parenchyma damage.