

ОРИЕНТАЦИЯ ГАПТЕНА И СПЕЦИФИЧНОСТЬ ИММУНОАНАЛИЗА МАЛЫХ МОЛЕКУЛ

М.А. Буркин, И.А. Гальвидис

НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Возможности конъюгационной химии не всегда позволяют необходимым образом ориентировать гаптен на молекуле иммуногена, чтобы обеспечить презентацию целевых (групповых или индивидуальных) детерминант, для индукции специфических антител. В настоящем исследовании, было исследовано влияние ориентации гликопептидных антибиотиков конъюгированных с белковым носителем, взятых в качестве модельных иммуногенов, на специфический репертуар иммунного ответа и создание систем их иммунохимического распознавания.

Антибиотики ристомидин А (РСТ), тейкопланин (ТПЛ), ванкомицин (ВКМ) и эремомидин (ЭРМ), несмотря на индивидуальные особенности, являются структурно-родственными гликопептидами (ГП) с единым механизмом антимикробной активности, связанным с подавлением полимеризации пептидогликана клеточной стенки грамположительных микроорганизмов за счет связывания с D-Ala-D-Ala фрагментом (**Рисунок 1**).

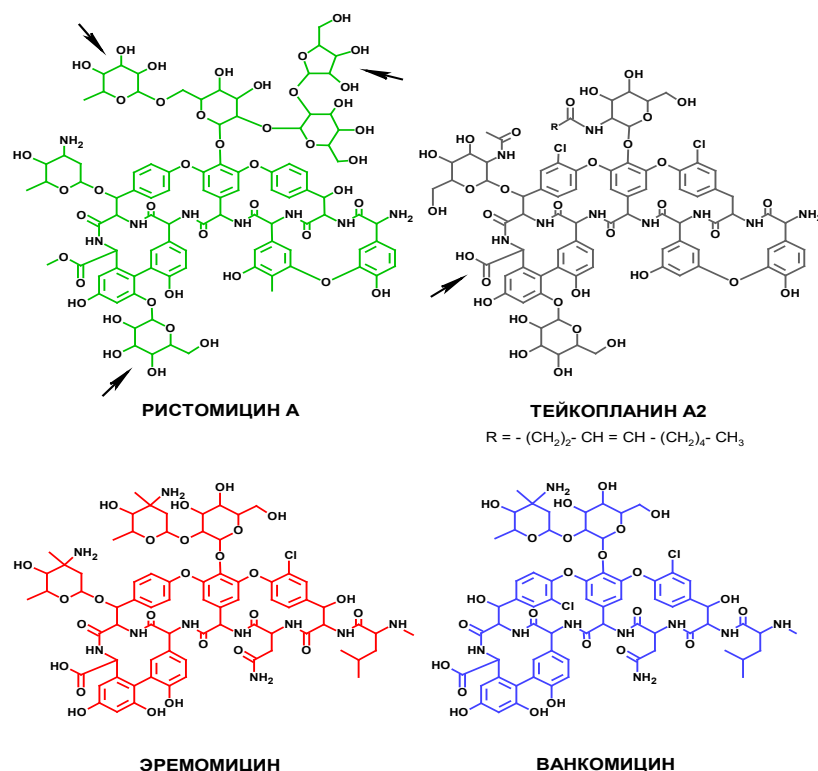


Рисунок 1. Структурные формулы гликопептидных антибиотиков. Сайты вероятного конъюгирования между антибиотиками и белками в иммуногенах обозначены стрелками.

Единый тип рецепции данных соединений подразумевает наличие у них идентичных структур, которые могут служить мишенью для их группового выявления. Среди иммунохимических методов описаны разные варианты определения ВКМ, ЭРМ и ТПЛ [1–3], однако отсутствуют сообщения о РСМ- и групповом иммуноанализе гликопептидов. В связи с этим, в настоящем исследовании предпринята попытка использования РСМ, в качестве нового гаптена, и ТПЛ для получения групп-специфических антител и создания единого метода для определения ГП антибиотиков. Эффект строго определенной и смешанной ориентации гаптена в составе иммуногена на спектр специфичности полученных иммунореагентов также являлись предметом изучения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Приготовление конъюгатов. Для приготовления конъюгированных антигенов использовали методы конъюгационной химии, вовлекающие разные функциональные группы ГП. Конъюгаты на основе желатины (ЖЕЛ) в дальнейшем использовались в качестве твердофазных антигенов в иммуноферментном анализе (ИФА), а БСА-конъюгаты – для иммунизации.

ЖЕЛ-PCM(га) и ЖЕЛ-ТПЛ(га) были приготовлены глутаральдегидным методом, использующим для конъюгирования с белком аминокислоты гаптенов [4].

ЖЕЛ(пи) – PCM и ЖЕЛ(пи) – ТПЛ были образованы в ходе восстановительного аминирования между аминокислотами гаптенов и периодат-окисленным гликопротеином [5].

ЖЕЛ-PCM(эдк), ЖЕЛ-ТПЛ(эдк), а также ЖЕЛ-PCM(аз), ЖЕЛ-ТПЛ(аз) и БСА-ТПЛ(аз) конъюгаты были получены в результате конденсации с 1-этил-3- (3-диметиламинопропил) карбодиимидом (эдк) и в реакции активированных эфиров (аз) с N-гидроксисукцинимидом между карбоксильными группами ГП и аминами белков [4]. Хотя ЭДК воздействует преимущественно на карбоксильные группы, в их отсутствие, как у PCM, возможной мишенью карбодиимидной активации и потенциальным сайтом конъюгирования может стать фенольная группа [6].

ЖЕЛ-PCM(ф) и ЖЕЛ-ТПЛ(ф) были приготовлены в реакции Манниха при использовании формальдегида в качестве сшивающего агента. Наиболее вероятным сайтом конъюгирования были фенол-резорциловые группировки гаптенов [2].

ЖЕЛ-PCM(пи), ЖЕЛ-ТПЛ(пи) и БСА-PCM(пи) Углеводные заместители гликопептидов окисляли периодатом натрия при его 1–3-кратном мольном избытке и подвергали восстановительному аминированию с белковыми аминокислотами [7].

При синтезе твердофазных антигенов соблюдали молярные соотношения ЖЕЛ/антибиотик – 1/25, а для синтеза иммуногенов соотношение между БСА и гаптенами составило 1/50. Все полученные конъюгаты очищали от избыточных реагентов в ходе диализа против фосфатно-солевого буфера (ФСБ, pH 7.2) в течение 2 сут при 10 °C при порозности диализной мембраны 14 кДа. Препараты конъюгатов (1 мг/мл) хранили при –15 °C в 50 % глицерине. Образование конъюгатов подтверждали на сканирующем спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония).

Иммунизация и подготовка антител. Схема иммунизации животных БСА-PCM(пи) и БСА-ТПЛ(аз) была одинаковой. Кроликам (2.0–2.5 кг) подкожно вводили по 100 мкг конъюгатов, эмульгированных в полном адьюванте Фрейнда. Последующие инъекции осуществляли ежемесячно, той же дозой иммуногенов в физрастворе. Спустя неделю после иммунизации брали кровь, а сыворотку анализировали в ИФА.

Процедура ИФА. Конъюгаты ГП на основе ЖЕЛ адсорбировали в 96-луночных планшетах Costar в карбонат-бикарбонатном буфере (pH 9.6) течение ночи при 4° C. Планшеты трижды отмывали с использованием ФСБ с 0,05 % Твин-20 (ФСБ-Т). Затем в лунки вносили по 0.1 мл стандартных растворов ГП (0.1 -10000 нг/мл, (В) и 0 нг/мл, (В₀)) в ФСБ-Т и по 0,1 мл рабочего раствора антител и инкубировали 1 ч при 25 °C. После отмывки, связанные антитела проявляли с помощью антител к IgG кролика, меченных пероксидазой (1 ч, 37 °C). Ферментативную реакцию проводили с ТМБ-субстратной смесью, которую останавливали спустя 30 мин 1М H₂ SO₄, а оптическую плотность реакции учитывали при 450 нм с помощью StatFax 2100 (США). Относительное связывание антител (В/В₀) было обратно пропорционально концентрации аналита. По дозозависимым кривым для каждого антибиотика определяли его концентрацию 50 %-ного ингибирования связывания антител (IC₅₀). О специфичности судили по перекрестной активности антител в отношении структурных аналогов и рассчитывали как отношение концентраций IC₅₀ главный аналит / IC₅₀ аналог.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез конъюгированных антигенов. Молекулы гликопептидов имеют целый ряд функциональных групп, которые позволяют использовать различные методы их конъюгирования с белками и, таким образом, по-разному ориентировать гаптен на носителе (**Рисунок 1**). В работе для получения конъюгатов использовали 6 различных методов конъюгирования, которые приводили к формированию 5 вариантов ковалентной связи (эдк = аз) между гаптенем и носителем, как минимум по 4 функциональным группам гаптена (**Таблица 1**). Разнообразие достигнутого таким образом пространственного положения гаптена на носителе позволяло презентировать на антигене различные эпитопы гаптена. Этот прием обеспечил возможность избирательного связывания с антителами различной эпитопной специфичности и управления специфичностью анализа.

Таблица 1. Типы твердофазных антигенов, использованные в работе

Функциональные группы гаптена	Твердофазные антигены, приготовленные на основе ГП		Тип связи между белком (PR) и ГП в конъюгате
	PCM	ТПЛ	
Амин	ЖЕЛ-PCM(га)	ЖЕЛ-ТПЛ(га)	[PR-NH]-(CH ₂) ₅ -[NH-ГП]
	ЖЕЛ(пи) – PCM	ЖЕЛ(пи) – ТПЛ	[PR=CH]-[NH-ГП]
Карбоксил		ЖЕЛ-ТПЛ(эдк)	[PR-NH]-[CO-ГП]
		ЖЕЛ-ТПЛ(аз)	[PR-NH]-[CO-ГП]
Фенил, Резорцил	ЖЕЛ-PCM(ф)	ЖЕЛ-ТПЛ(ф)	[PR-NH] – CH ₂ -[CH=ГП]
	ЖЕЛ-PCM(эдк)		
	ЖЕЛ-PCM(аз)		
Углеродные гидроксилы	ЖЕЛ-PCM(пи)	ЖЕЛ-ТПЛ(пи)	[PR-NH]-[CH=ГП]

Получение антител и исследование специфичности анализа. При выборе иммуногена мы преследовали две цели 1) оценить специфичность иммунного ответа при экспозиции на иммуногене общих или индивидуальных детерминант гликопептидов, а также 2) исследовать эффект разнообразия презентации иммуногаптена на репертуар индуцируемых антител.

Несмотря на общее структурное сходство между PCM и ТПЛ, индивидуальные различия особенно выражены в верхней части их формул (**Рисунок 1**) – длинный алифатический заместитель у ТПЛ и тетрасахаридный фрагмент у PCM. Чтобы скрыть эти отличительные структурные черты, конъюгирование PCM с БСА проводили с преимущественным вовлечением тетрасахаридного фрагмента, тем самым экранируя его от иммунного ответа белковым носителем.

При получении антител к ТПЛ, напротив, использовали иммуноген, в котором индивидуальные детерминанты ТПЛ не участвовали в конъюгировании с носителем и были наилучшим образом представлены на иммуногене. С этой целью конъюгирование проводили по удаленной от этого сайта карбоксильной группе ТПЛ, используя метод активированных эфиров.

Оба антигена, БСА-PCM(пи) и БСА-ТПЛ(аз), выбранных для иммунизации, служили одновременно примерами конъюгатов со смешанной и однозначной ориентацией гаптена на носителе. Сайты наиболее вероятного конъюгирования указаны на **Рисунке 1** стрелками. Под контролем иммунного ответа была проведена серия иммунизаций, которая после пятого введения иммуногенов позволила получить антитела, обеспечивающие наилучшую чувствительность ИФА. Специфичность взаимодействия полученных антител, анти-БСА-PCM(пи) и анти-БСА-ТПЛ(аз), в дальнейшем изучали на панели конъюгированных твердофазных антигенов (**Таблица 1**) в конкурентном ИФА и оценивали профиль перекрестного взаимодействия с гликопептидами PCM, ТПЛ, ЭРМ и ВКМ. Благодаря различному дизайну и ориентации гаптенных групп, эти конъюгаты, иммобилизованные на полистироловых планшетах, могли взаимодействовать с различными субпопуляциями анти-гаптенных антител сыворотки. Такой подход позволял переформатировать анализ индивидуальных соединений на распознавание целой группы аналитов, что было показано на примере 16-членных макролидов, амфениколов [8] и фторхинолонов [9]. В настоящей работе на модели ГП антибиотиков мы исследовали роль экспозиции иммуногаптена на репертуар индуцируемых антител и эффективность антиген-опосредованной коррекции специфичности.

Анти-БСА-PCM(пи). Взаимодействие анти-БСА-PCM(пи) с конъюгатами гомологичного (PCM) и гетерологичного (ТПЛ) гаптенных кардинально отличалось. Независимо от дизайна твердофазных антигенов, специфичность ИФА вариантов на основе PCM-конъюгатов (**Таблица 2А**) оставалась исключительно PCM-селективной. ТПЛ, ВКМ и ЭРМ не проявляли заметной ингибирующей активности ($B/B_0 > 85\%$) даже в концентрациях 1000 нг/мл, а их перекрестная активность не превышала 0.3 %. Метод конъюгации ЖЕЛ-PCM приносил изменения в презентацию PCM на антигенах и его распознавание антителами, что изменяло чувствительность анализа в диапазоне от 4.2 до 35 нг/мл.

Критическое изменение специфичности анализа происходило при замене иммобилизованного гаптена на гетерологичный ТПЛ (**Таблица 2В**). Иммобилизация ТПЛ на твердой фазе позволяла антителам к PCM связываться со структурами общими как для PCM, так и ТПЛ и других представителей этой группы соединений.

Благодаря разнообразному дизайну ТПЛ-конъюгатов, вариант с наиболее оптимальной ориентацией ТПЛ был выявлен, который обеспечивал связывание антител к групповым эпитопам. Так, ИФА на основе иммобилизованного ЖЕЛ-ТПЛ(пи) характеризовался наиболее выраженным групповым определением ГП с перекрестно активностью в отношении РСМ, ВКМ, ТПЛ и ЭРМ в диапазоне 37–100 %. Рабочий диапазон данного анализа 10–10000 нг/мл оказался приемлем для определения терапевтических концентраций данных антибиотиков в плазме крови [10].

Таблица 2. Перекрестное взаимодействие (%) анти-БСА-РСМ(пи) (А, В) и анти-ТПЛ(аэ) (С) антител с ГП в ИФА при иммобилизации на твердой фазе конъюгатов разного дизайна

А.	Иммобилизованные антигены на основе РСМ					
ГП	ЖЕЛ-РСМ(га)	ЖЕЛ(пи) – РСМ	ЖЕЛ-РСМ(ф)	ЖЕЛ-РСМ(эдк)	ЖЕЛ-РСМ(аэ)	ЖЕЛ-РСМ(пи)
РСМ	100 (35)*	100 (4.2)	100 (35)	100 (18)	100 (5.2)	100 (12)
ТПЛ	< 0.3	< 0.04	< 0.3	< 0.2	< 0.05	< 0.1
ЭРМ	< 0.3	< 0.04	< 0.3	< 0.2	< 0.05	< 0.1
ВКМ	< 0.3	< 0.04	< 0.3	< 0.2	< 0.05	< 0.1
В.	Иммобилизованные антигены на основе ТПЛ					
ГП	ЖЕЛ-ТПЛ(га)	ЖЕЛ(пи) – ТПЛ	ЖЕЛ-ТПЛ(ф)	ЖЕЛ-ТПЛ(эдк)	ЖЕЛ-ТПЛ(аэ)	ЖЕЛ-ТПЛ(пи)
РСМ	100 (118)*	-**	100 (393)	-	100 (350)	100 (90)
ТПЛ	77	-	462	-	402	37
ЭРМ	4.2	-	7.4	-	8.1	100
ВКМ	42	-	< 3.9	-	< 3.5	37
С.	Иммобилизованные антигены на основе ТПЛ					
ГП	ЖЕЛ-ТПЛ(га)	ЖЕЛ(пи) – ТПЛ	ЖЕЛ-ТПЛ(ф)	ЖЕЛ-ТПЛ(эдк)	ЖЕЛ-ТПЛ(аэ)	ЖЕЛ-ТПЛ(пи)
РСМ	100 (5.0)*	100 (7.4)	100 (3.8)	-**	-	100 (3.5)
ТПЛ	< 0.5	< 0.5	< 0.5	-	-	< 0.5
ЭРМ	< 0.5	< 0.5	< 0.5	-	-	< 0.5
ВКМ	< 0.5	< 0.5	< 0.5	-	-	< 0.5
* – Чувствительность анализа представлена значением IC ₅₀ (нг/мл).						
** – Взаимодействие не происходило, либо не подавлялось свободным гаптенем.						

Таким образом, конъюгация РСМ по нескольким сайтам на его углеводных фрагментах способствовала его разнообразной ориентации на иммуногене и индуцировала выработку антител с мульти-эпитопной специфичностью. Последующее аффинное «фракционирование» с помощью антигенов разного структурного дизайна оказалось весьма эффективным и позволило разработать анализ как селективным определением РСМ, так и для группового выявления нескольких ГП.

Анти-БСА-ТПЛ(аэ). Иммунная реакция на однозначно ориентированный гаптен рассматривалась в работе на примере Анти-БСА-ТПЛ(аэ), перекрестное взаимодействие которых с представителями ГП изучалось на всей панели приготовленных конъюгатов. Однако, было обнаружено, что лишь конъюгаты на основе гомологичного гаптена способны взаимодействовать с анти-БСА-ТПЛ(аэ). Связывание антител с ЖЕЛ-ТПЛ(аэ) и ЖЕЛ-ТПЛ(эдк) гомологичными по типу связи между гаптенем и носителем было активным, но не могло подавляться свободным гаптенем (Таблица 2С).

Специфичность остальных 4 вариантов анализа, несмотря на различную презентацию ТПЛ на твердофазных антигенах, оказалась строго ТПЛ-селективной, и чувствительность варьировала незначительно (IC₅₀ = 3.5–7.4 нг/мл) по сравнению с более выраженным эффектом на РСМ-системах анализа (IC₅₀ = 4.2–35 нг/мл). Рабочий диапазон анализа ТПЛ составил 0.2–100 нг/мл, позволял тестировать минимальные объемы биологических жидкостей и элиминировать возможный матрикс-эффект за счет разведения образца.

Выявленные различия между иммунным ответом на РСМ и ТПЛ связаны с репертуаром специфичности антител, сформированным в ответ на доступные детерминанты гаптена. Чем более однозначной является ориентация гаптена на белковом носителе, тем более ограничен репертуар специфичности антител и более однородны их свойства в изменяющихся условиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа посвящена изучению взаимосвязи между пространственным представлением гаптена в составе иммуногена и репертуаром иммунного ответа с целью создания групп-специфических иммунореагентов. Гликопептидные антибиотики в качестве модельных гаптен/аналитов были презентированы на иммуногенах в однозначной и смешанной ориентации с помощью соответствующих методов конъюгации. Поликлональные анти-ТПЛ антитела, полученные к БСА-ТПЛ(аэ) со строго определенным положением ТПЛ, продемонстрировали селективность по отношению к ТПЛ и были неспособны распознавать родственные ГП. Репертуар антител был однородным, специфичность анализа оставалась неизменной при модификации твердофазного антигена, а чувствительность 4 вариантов ИФА к ТПЛ варьировала незначительно 3,5–7,4 нг/мл.

PCM был конъюгирован с БСА по нескольким гликозидным сайтам, поэтому был по-разному ориентирован на иммуногене. Этот иммуноген стимулировал выработку более широкого спектра антител с различной субспецифичностью. Анти-PCM-антитела позволяли селективно выявлять PCM в ИФА на антигенах с гомологичным гаптенем, чувствительность варьировала от 4,2 до 35 нг/мл. Один из гетерологичных антигенов, ЖЕЛ-ТПЛ(пи), был выбран в качестве специфического сорбента для связывания анти-PCM антител к общим групповым эпитопам ГП. Эти реагенты послужили основой группового ИФА для выявления PCM, ТПЛ, ЭРМ и ВКМ с перекрестной реактивностью 37–100 % и детекцией в диапазоне 10–10000 нг/мл. Таким образом, смешанная ориентация иммунизирующего гаптена, в отличие от однозначной пространственной ориентации, способствует расширению репертуара иммунного ответа к эпитопам гаптена и открывает более широкие возможности для селекции реагента с требуемой тонкой специфичностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pfaller M.A., Krogstad D.J., Granich G.G., Murray P.R. Laboratory evaluation of five assay methods for vancomycin: Bioassay, high-pressure liquid chromatography, fluorescence polarization immunoassay, radioimmunoassay, and fluorescence immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 1984, 20, 311–316.
2. Burkin M.A.; Burkin A.A. Enzyme immunoassay for the determination of the glycopeptide antibiotic eremomycin. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2009, 45, 210–214.
3. Corti A., Cavenaghi L., Giani E., Cassani G. A receptor-antibody sandwich assay for teicoplanin. *Clin. Chem.* 1987, 33, 1615–1618.
4. Hermanson G.T. *Bioconjugate Techniques*, 3d ed.; Elsevier: Amsterdam, 2013; p. 1140.
5. Galvidis I.A., Eremin S.A., Burkin M.A. Development of indirect competitive enzyme-linked immunoassay of colistin for milk and egg analysis. *Food Agric. Immunol.* 2020, 31(1), 424–434.
6. Carraway K.L., Koshland D.E. Jr. Reaction of tyrosine residues in proteins with carbodiimide reagents. *Biochim. Biophys. Acta* 1968, 160, 272–274.
7. Galvidis I.A., Burkin K.M., Eremin S.A., Burkin M.A. Group-specific detection of 2-deoxystreptamine aminoglycosides in honey based on antibodies against ribostamycin. *Anal. Methods* 2019, 11, 4620–4628.
8. Galvidis I.A., Eremin S.A., Burkin M.A. Three for the price of one! Immunodetection of three amphenicols in foodstuffs using universal standard curve. *Anal. Methods* 2020, 12, 1728–1735.
9. Burkin M.A., Galvidis I.A. Simultaneous and differential determination of drugs and metabolites using the same antibody: Difloxacin and sarafloxacin case. *Anal. Methods* 2016, 8, 5843–5850.
10. Lamont, E.; Seaton, R.A.; Macpherson, M.; Semple, L.; Bell, E.; Thomson, A.H. Development of teicoplanin dosage guidelines for patients treated within an outpatient parenteral antibiotic therapy (OPAT) programme. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009, 64, 181–187.