

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 577.15

©Коллектив авторов

ПОЛУЧЕНИЕ КОНЬЮГАТОВ L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ С АНТИТЕЛАМИ.

Н.В. ГОГИЧАЕВА¹, Е.В. ЛУКАШЕВА¹, Е.М. ГАВРИЛОВА², И.П. СМИРНОВА¹,
А.М. ЕГОРОВ², Т.Т. БЕРЕЗОВ¹.

¹Российский Университет Дружбы народов, кафедра биохимии, 117198, Москва,
Россия, тел/факс: 434-04-12;

²Московский государственный университет, кафедра химической энзимологии,
119899, Москва, Россия, тел: 939-27-27, факс 939-27-42.

Разработаны методы получения конъюгатов L-лизин- α -оксидазы и антител. Конъюгаты получали тремя способами: 1) окислением углеводного компонента L-лизин α -оксидазы и последующим ковалентным связыванием образовавшихся альдегидных групп с аминокетонами антител; 2) с помощью бифункционального сшивающего реагента - глутарового альдегида; 3) с использованием окисленной по углеводному компоненту пероксидазы в качестве "мостиковой" молекулы для связывания ее с аминокетонами антител и L-лизин α -оксидазы. Проведено сравнительное изучение каталитической и иммунологической активности полученных конъюгатов.

При окислении углеводного компонента L-лизин α -оксидазы наблюдалась большая потеря каталитической активности. Остаточная активность после обработки периодатом натрия не превышала - 0,8%, а после ковалентного связывания с антителами снижалась до 0,2%.

Установлено, что наибольшая лизиноксидазная активность наблюдается у конъюгатов, полученных третьим способом (78% от активности исходного фермента). Конъюгаты, полученные вторым способом, сохраняли около 70% активности нативной L-лизин- α -оксидазы.

Ключевые слова: L-лизин- α -оксидаза, пероксидаза, антитела, конъюгат, направленный транспорт.

ВВЕДЕНИЕ. Впервые фермент L-лизин- α -оксидаза был открыт японскими учеными в лаборатории профессора K.Soda. Были разработаны методы его получения, определены антиопухолевые, противовирусные, антибактериальные свойства [1]. На кафедре биохимии Университета Дружбы народов в течение нескольких лет проводились исследования L-лизин- α -оксидазы из триходермы. Был найден отечественный штамм-продуцент фермента, разработаны методы очистки последнего до гомогенного состояния, исследована его каталитическая и биологическая активность [2,3].

L-лизин- α -оксидаза представляет собой гликопептид с молекулярной массой 120000 Да, состоящий из двух идентичных субъединиц. Фермент катализирует окислительное дезаминирование лизина с образованием α -кето- α -аминокапроновой кислоты и перекиси водорода. Исследование избирательности действия показало, что L-лизин- α -оксидаза действует практически только на L-лизин и лишь в небольшой степени (менее 6% от активности по отношению к L-лизу) на две другие аминокислоты, которые могут рассматриваться как структурные аналоги L-лизина: L-орнитин и L-аргинин [4].

В организме действие такого фермента приводит к уменьшению концентрации незаменимой аминокислоты L-лизина в крови; образующаяся H_2O_2 , вероятно, может оказывать антиопухолевое действие, усиливая окислительный стресс в клетках [5,6]. Наилучшие результаты по антипролиферативной активности L-лизин- α -оксидазы были получены на первичных опухолях животных. Показано *in vivo*, что L-лизин- α -оксидаза обладает более широким спектром антиопухолевого действия по сравнению с L-аспарагиной, что делает ее перспективной в химиотерапии опухолей [7].

Лекарственные препараты нового поколения должны обладать наряду с высокой избирательностью действия способностью целенаправленного транспорта к пораженному органу.

Для обеспечения направленного транспорта лекарственного средства в организме используют его конъюгаты с молекулой-вектором, специфически связывающимся с определенным участком клеток-мишеней или тканей. В качестве подобных векторов могут быть использованы антитела к поверхностным антигенам клеток, химические соединения специфически реагирующие с рецепторами на клетках и тканях [8,9].

Целью данного исследования была разработка методов получения конъюгатов L-лизин- α -оксидазы из *Trichoderma sp.* (ЛО) с антителами мыши против пероксидазы из корней хрена (ПХ) и антителами осла против IgG кролика.

МЕТОДИКА. При получении конъюгатов использовались: L-лизин- α -оксидаза (ЛО) из *Trichoderma sp.*, $NaIO_4$, $NaHCO_3$ (ч), Na_2CO_3 (хч), антитела (АТ) (мышинные антипероксидазные, ослиные против Ig кролика), Na_2HPO_4 (ч), $NaCl$ (ч), $NaOH$ (чда 'Chemapol'), L-лизин ('Биолар'), боргидрид натрия ('Sigma'), пероксидаза хрена (ПХ) ('Merck'), *o*-дианизидин (Олайнский завод химических реактивов).

Активность ЛО определяли спектрофотометрически при длине волны 460 нм по скорости нарастания оптической плотности продукта пероксидазного окисления *o*-дианизидина перекисью водорода, образующейся в результате окислительного дезаминирования L-лизина. Реакционная смесь содержала: 1

мМ лизин, 2×10^{-4} М *o*-дианизидин, $2,5 \times 10^{-7}$ М ПХ, 25 мкл раствора ЛО и 0,1 М натрий фосфатный буфер pH 7,5 и ЛО.

Активность антител контролировали методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием в качестве твердой фазы полистироловых планшетов (фирма "БИОХИТ", Финляндия). Схема постановки метода включала следующие стадии:

1) иммобилизацию антигена - 100 мкл р-ра антигена вносили в лунки планшета и инкубировали в течение 1,5 часов при 37°C, после чего промывали два раза буфером 1 (0,01 М NaH_2PO_4 , NaOH, 0,15 М NaCl и 0,05 М твин 20, pH 7,4) и один раз буфером 2 (0,01 М NaH_2PO_4 , NaOH, 0,15 М NaCl pH 7,4), после промывки буфер тщательно удаляли.

2) инкубацию раствора конъюгата фермент-антитело с иммобилизованным антигеном 1,5 часа при 37°C, (в каждую лунку вносили по 100 мкл р-ра конъюгата, в буфере 2 (концентрацию конъюгата варьировали методом последовательных двукратных разведений в диапазоне (2000 - 65 нг/мл).

3) трехкратную отмывку планшета от неспецифически связавшихся компонентов реакции буфером 1.

4) выявление иммобилизованного иммунного комплекса проводили регистрируя активность ЛО. В случае использования конъюгатов, полученных по способу 2, маркером связывания служила ПХ.

5) активность ПХ в твердофазном иммуноферментном анализе контролировали в реакции пероксидазного окисления *o*-фенилендиамина (ОФД) перекисью водорода. Накопление окрашенного продукта реакции регистрировали по оптическому поглощению при длине волны 490 нм. В каждую лунку вносили 100 мкл реакционной смеси, которая содержала 2 мМ H_2O_2 и 0,6 мМ ОФД.

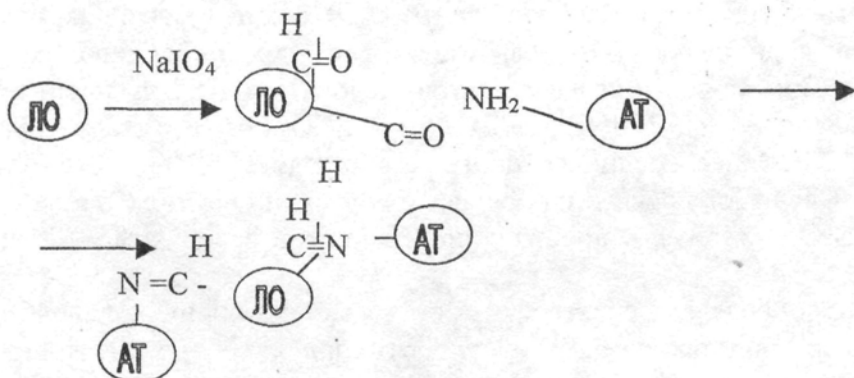
При использовании в качестве антигена ПХ, на планшеты сорбировали предварительно инактивированную ПХ. Инактивацию ПХ проводили следующим образом: к раствору $5,7 \times 10^{-5}$ М ПХ в 0,05 М в цитрат-фосфатном буфере pH 4,5 добавляли раствор 0,46 М NaN_3 и 1,5 мл концентрированной H_2O_2 , общий объем реакционной смеси - 3,5 мл.

Методы получения конъюгатов ЛО с антителами:

Метод 1 А (периодатное окисление).

Углеводный компонент ЛО окисляли различными концентрациями NaIO_4 , после чего проводили реакцию ковалентного связывания с аминокруппами антител.

Схематически реакция может быть представлена следующим образом:



К 4 пробам ЛО в воде (3 мг/мл), добавляли различные количества NaIO_4 , инкубировали 20 минут в темноте при комнатной температуре, после чего проводили диализ окисленных препаратов ЛО против 0,01М карбонатного буфера pH 9,5 в течение суток. Данные по активности окисленной ЛО представлены в табл. 1.

Таблица 1. Активность фермента при получении конъюгата L-лизин- α -оксидазы оксидазы и антител методом 1А.

Исходная активность.	ЛО: NaIO_4	Активность окисл.ЛО, Е	Конъюгация ЛО:АТ	Активность ЛО в конъюгате, Е	Выход,% по активности
87	1:500	1,2	1:1	0,18	0,2
87	1:160	4,3	1:1	0,72	0,8
40,2	1:800	0,3	1:1	0,14	0,35
40,2	1:80	0,8	1:1	0,48	1,2

Примечание: Здесь и далее активность выражена в единицах (Е). Остальные пояснения приведены в тексте.

Реакцию ковалентного связывания проводили добавлением к 1 мл окисленной ЛО раствора IgG фракции сыворотки крови мыши против ПХ в том же буфере. Концентрации реагентов рассчитывали таким образом, чтобы при этом молярное соотношение фермент-антитела составило 1: 1. Смесь фермента с антителами инкубировали в течение двух часов при комнатной температуре и встряхивании. После завершения инкубации добавляли боргидрид натрия, выдерживали смесь в течение двух часов, диализовали против натрий-фосфатного буфера pH 7,4 и в полученном конъюгате определяли активность ЛО.

Метод 1 Б.

Раствор ЛО в воде (4 пробы) с концентрацией белка 3 мг/мл инкубировали с различными количествами 0,02 М NaIO_4 (табл. 2) в течение различных интервалов времени: 5, 10, 15, 20 мин в темноте при комнатной температуре и встряхивании. Реакцию останавливали добавлением 0,1 мл этиленгликоля, затем проводили диализ против 0,01 М карбонатного буфера pH 9,5 в течение суток.

Таблица 2. Активность фермента при получении конъюгата L-лизин- α -оксидазы и антител методом 1Б.

Исходная актив.ЛО	ЛО: NaIO_4	Время инкуб., мин	Акт. окисл ЛО,Е	ЛО:АТ	Акт. ЛО в конъюгате,	Выход по активности ЛО, %
61	26	5	3,08	1:1	3,00	4,9
38	22	10	2,14	1:1	1,55	4,1
50	24	15	3,62	1:1	1,98	3,9
78	22	20	1,40	1:1	1,40	1,8

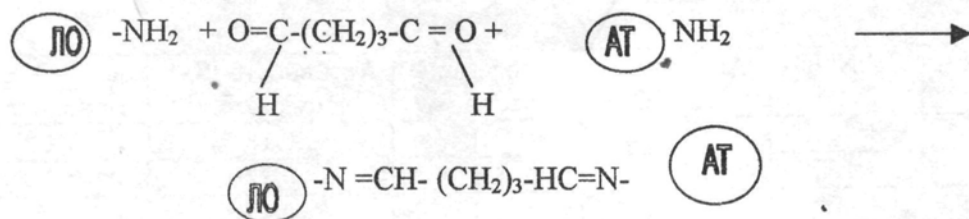
К окисленной ЛО добавляли фракцию IgG сыворотки мыши, антитела против ПХ (молярное отношение фермент/антитела составляло 1:1), смесь инкубировали в течение двух часов при комнатной температуре, добавляли боргидрид натрия 0,1 мл (4мг/мл) и проводили диализ против буфера 2.

Метод 2 (глутаральдегидный метод).

В работе апробированы две модификации метода - одно- и двухстадийная.

Одностадийная модификация.

Для синтеза конъюгата было использовано 6 проб с различным молярным соотношением фермента, антител и глутарового альдегида. (табл.3). Растворы инкубировали в течение часа при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Через час добавляли боргидрид натрия, затем проводили диализ против буфера 2.



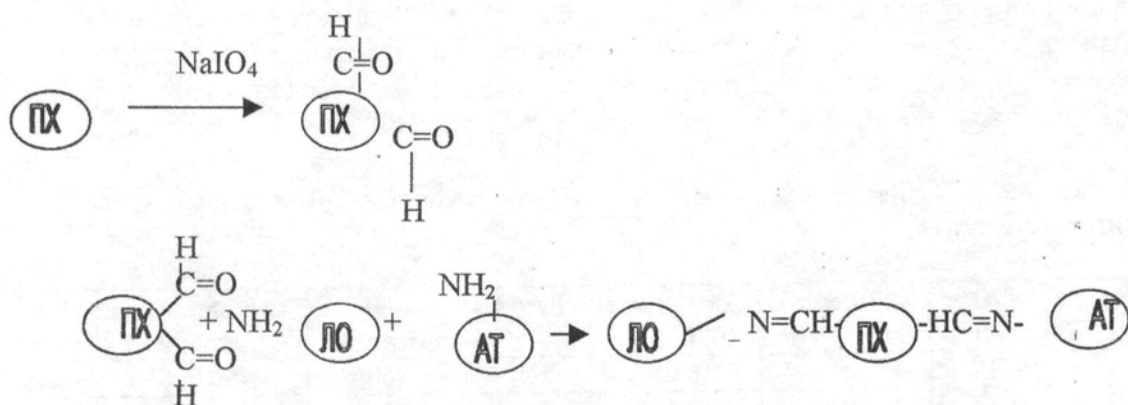
Двухстадийная модификация.

К раствору ЛО добавляли избыток ГА (см. табл.3) инкубировали при комнатной температуре в течение часа при постоянном перемешивании, затем проводили диализ в течение суток, добавляли антитела и снова инкубировали в таких же условиях.

Метод 3 (получение конъюгатов с помощью окисленной пероксидазы).

Суть метода заключалась в использовании окисленной по углеводному компоненту ПХ в качестве "мостиковой" молекулы, связывающей ЛО и антитела.

Метод осуществляется в два этапа: 1) окисление углеводного компонента ПХ периодатом натрия, 2) проведение реакции ковалентного связывания полученных альдегидных групп с ЛО и антителами:



Окисление ПХ проводили NaIO_4 (к 1 мл $1,2 \times 10^{-4}$ М раствора ПХ добавляли 0,2 мл 0,1 М раствора NaIO_4), инкубировали 30 минут при комнатной температуре и постоянном перемешивании в темноте, после чего диализовали против 0,001 М ацетатного буфера pH 4,5.

Таблица 3. Активность L-лизин- α -оксидазы при получении конъюгатов глутаральдегидным способом (метод 2).

ЛО, М	Количество АТ, М	ЛО: АТ: глутар альд.	Глутар. альд, М	Время инкубации, час	Активность ЛО До После Конъюгации		Выход по активности ЛО, %	Мол. масса
$7,7 \cdot 10^{-9}$	$17,9 \cdot 10^{-9}$	1:2,3:1,5	$5 \cdot 10^{-9}$	1	42	20,2	48	467000
$6 \cdot 10^{-9}$	$9 \cdot 10^{-9}$	1:1,5:0,8	$5 \cdot 10^{-9}$	1	1,8	0,308	17	Не опр.
$6 \cdot 10^{-9}$	$9 \cdot 10^{-9}$	1:1,5:0,4	$2,5 \cdot 10^{-9}$	1	1,8	0,341	19	Не опр.
$6 \cdot 10^{-9}$	$9 \cdot 10^{-9}$	1:1,5:0,2	$1 \cdot 10^{-9}$	1	1,8	0,368	20	338000
$1,5 \cdot 10^{-9}$	$1,7 \cdot 10^{-9}$	1:1,1:1,5	$2 \cdot 10^{-9}$	1	4,13	2,09	51	400000
$1,5 \cdot 10^{-9}$	$1,7 \cdot 10^{-9}$	1:1,1:1,5	$2 \cdot 10^{-9}$	1+1	4,13	2,9	70	436000

Реакцию ковалентного связывания для получения конъюгата проводили двумя способами:

1) к окисленной ПХ одновременно добавляли ЛО, антитела и перемешивали в течение двух часов.

2) к окисленной ПХ добавляли ЛО, один час инкубировали, затем в реакционную смесь вносили антитела и продолжали инкубацию еще один час.

После инкубации в реакционную смесь вносили 50 мкл боргидрида натрия (4 мг/мл) и через 30 мин помещали на диализ в течение суток против буфера 2. В полученных конъюгатах определяли активность антител, ПХ и ЛО.

Молекулярную массу конъюгатов определяли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-200 (75 x 1,5 см). Для калибровки колонки по молекулярной массе использовали следующие маркеры: ферритин (450000 Да), альдолаза мышц кролика (160000 Да), каталаза (240000 Да), бычий сывороточный альбумин (67000 Да).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Получение конъюгатов ЛО с антителами проводили тремя методами: 1) окисление углеводного компонента ЛО периодатом натрия; 2) использование бифункционального сшивающего агента – глутарого альдегида; 3) использование «мостиковой молекулы» - ПХ.

Гель-фильтрация конъюгатов ЛО-АТ, полученных окислением углеводного компонента фермента (по методу 1а), показала наличие фракций с молекулярной массой конъюгата выше 300000 Да, обладающих активностью ЛО, что подтверждает наличие конъюгатов.

Исследование активности окисленных форм ЛО показало ее снижение до 0,8 - 4,9 % от активности нативной ЛО, во фракциях конъюгата наблюдалось дальнейшее падение активности до 0,35-1,2% (табл.1). Из-за низкой активности условия реакции в методе 1б были изменены на более мягкие - снижены концентрации NaIO_4 и время реакции (табл.2). Молекулярная масса конъюгатов, полученных по методу 1б, составила от 250000 до 450000 Да. Этот способ позволил несколько снизить потери активности фермента в конъюгате в зависимости от времени реакции (табл.2). Остаточная активность ЛО в конъюгате колебалась от 1,8 до 4,9% от активности нативного фермента. Однако, несмотря на то, что использование более мягких условий окисления позволило несколько повысить выход конъюгатов по активности ЛО, он остается достаточно низким, что делает методику, основанную на окислении углеводного компонента ЛО, малоэффективной.

Таблица 4. Активность L-лизин- α -оксидазы при получении конъюгатов L-лизин- α -оксидаза*пероксидаза*антитела (метод 3).

Количество ЛО, моль	Количество АТ, моль	Количество пероксидазы, моль	Время инкубации, час	Выход по активности ЛО%	Мол. масса
$0,2 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-9}$	$5 \cdot 10^{-9}$	2	50	460000
$0,2 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-9}$	$5 \cdot 10^{-9}$	1+1	78	426000
$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-9}$	$2,5 \cdot 10^{-9}$	1+1	70	426000

При получении конъюгатов в данном эксперименте были использованы АТ мыши к ПХ. Активность АТ в конъюгате контролировали методом непрямого твердофазного ИФА. С этой целью на стенках лунок полистиролового планшета иммобилизовали инактивированную ПХ, а детекцию образовавшегося после инкубации с конъюгатом иммобилизованного комплекса проводили определяя активность ЛО. Образование комплекса таким образом зарегистрировать не удалось.

Гель-фильтрация продуктов синтеза конъюгатов с использованием глутарового альдегида (метод 2) показала наличие фракций с молекулярной массой от 338000 до 467000 Да и активностью ЛО, что свидетельствует о наличии конъюгатов ЛО с АТ. Потеря активности ЛО варьировала в зависимости от мольного соотношения фермент: антитела: глутаровый альдегид и составила от 30 до 83% (табл.3).

Активность антител при использовании данного способа, так же как и в предыдущем случае, определить с помощью твердофазного ИФА не удалось. Это может быть следствием того, что предел обнаружения ЛО в реакции, использованной для регистрации ее активности, выше, чем концентрация ЛО в составе конъюгата, связанного со стенками лунок.

Одним из возможных подходов для получения конъюгатов ЛО с антителами может служить метод, основанный на использовании "мостиковой" молекулы, несущей на своей поверхности большое количество центров для ковалентного связывания. В качестве такого "мостика" может быть использована окисленная по углеводному компоненту периодатом натрия ПХ, которая имеет на своей поверхности до 32 альдегидных групп и эффективно связывается с аминок группами антител [10]. Наличие у самой ПХ антиопухолевых свойств может значительно повысить эффективность действия антиопухолевого конъюгата с ЛО.

Молекулярная масса полученных этим способом конъюгатов составила до 457000 Да, снижение активности ЛО составило от 22 до 50 %, по сравнению с нативным ферментом. Определение активности нативной ПХ и ПХ в составе конъюгата показало, что "мостиковая" молекула сохраняет 20-30% активности исходного фермента.

Сравнительный анализ активностей ЛО, определенных с добавлением экзогенной ПХ и без нее, показал, что активность ЛО, определенная без внесения ПХ составила 30-40% от активности ЛО, определенной по методу, указанному в методике.

Активность антител (АТ осла против IgG кролика) контролировали непрямым твердофазным методом, в котором в качестве иммобилизованного

антигена использовали IgG кролика. Детекцию образовавшегося на стенках лунок комплекса IgG кролика-АТ-ЛО осуществляли регистрируя активность ПХ в реакции окисления ОФД перекисью водорода. Установлено, что титр антител в составе конъюгата АТ-ПХ-ЛО практически полностью соответствовал титру конъюгата АТ-ПХ, т.е. антитела практически не утратили связывающей способности.

Таким образом, разработан метод синтеза иммуноконъюгата с использованием ПХ, обеспечивающий сопряженность действия ферментов, обладающих антиопухолевой активностью.

Работа поддержана грантом программы «Университеты России – фундаментальные исследования».

ЛИТЕРАТУРА.

1. *Ishikawa E., Imagawa M., Hashida S., Yoshitake S., Haguchi Y* (1983), *J Immunoassay*, **4**, 209-327.
2. *Смирнова И.П., Алексеев С.Б., Березов Т.Т.* (1996), *Вопр. мед. химии*, **42**, 211-216.
3. *Хадуев С.Х., Лукашева Е.В., Смирнова И.П., Березов Т.Т.* (1987) *Вопр. мед. химии*, **33**, 1, 127-132.
4. *Лукашева Е.В. Березов Т.Т.* (1988), *Прикладная биохимия и микробиология*, **XXIV**, 4, 459-461.
5. *Kusakabe H., Sugi M., Kodama K., Yoshino A., Soda K.*, (1979), *Agric.Biol.Chem.*, **43**, 6, 1373-1375
6. *Березов Т.Т.* (1996) *Первый съезд онкологов стран СНГ*, Москва,
7. *Материалы съезда*, **1**, 470.
8. *Treshalina H.M., Lukasheva E.V., Guerassimova G.K., Gogichaeva N.V., Berezov T.T., et al.* (1998), *Abstr. International Symposium "Biocatalysis-98"*, Moscow, 62.
9. *Фремель Х., Хольцхайд Г.* (1987) *Иммунологические методы*. М. Медицина, 162-170.
10. *Кэтту Д., Райкундалиа Ч.* (1991), *Антитела* // М. Мир, **2**, 172-174.
11. *Дикова Е.Г., Гаврилова Е.М., Егоров А.М.* (1990), *Биоорг. химия*, **4**, 16, 476-481.

Поступила 3.03.00.

CONJUGATION OF L-LYSINE α -OXIDASE WITH ANTIBODIES.

N.V. GOGICHAeva¹, E.V. LUKASHEVA¹, E.M. GAVRILOVA², I.P.
SMIRNOVA¹, A.M. EGOROV², T.T. BEREZOV¹.

¹People's Friendship University, Moscow, Russia. Tel/fax: 07(095)434-0412,

²Moscow State Lomonosov University, Russia. Tel: 07(095)939-2727.

E-mail: berez@med.pfu.edu.ru

The conjugation of the drugs with vector molecules enables to obtain therapeutic preparation, which may be transported to the selected target organ. In the present work the methods of conjugation of antineoplastic enzyme L-lysine α -oxidase with antibodies were elaborated. Conjugates were worked out through the attachment of amino groups on the antibody surface either with the aldehyde groups which were created in L-lysine α -oxidase molecule (0.2% of initial enzymatic activity) or with the aldehyde groups of cross-linking molecules. Maximal (78%) L-lysine α -oxidase activity in conjugates was observed when oxidized peroxidase which contained the aldehyde groups was used as crosslinking agent. The glutaraldehyde method yielded 70% of initial enzyme activity

Key words: L-lysine α -oxidase, peroxidase, antibodies, conjugate, directed transport.