

## АВИДНОСТЬ ДВУХВАЛЕНТНЫХ АНТИТЕЛ. ПРОБЛЕМЫ ЕЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИЗМЕРЕНИЯ И ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ

С. А. БОБРОВНИК, М. А. ДЕМЧЕНКО, С. В. КОМИСАРЕНКО

*Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;  
e-mail: s-bobrov@bk.ru*

*В статье рассмотрены некоторые проблемы, встречающиеся при определении авидности двухвалентных антител в эксперименте или же с помощью теоретических подходов для случаев, когда аффинность антител является известной. Показано, что для определения части двухвалентных антител, остающихся свободными в их смеси с избытком антигена, что требуются для оценки авидности, нужны методы, чувствительность которых заметно превосходит чувствительность ELISA. Ранее существовавшие теоретические подходы не позволяли оценить авидность двухвалентных антител по целому ряду причин. Однако в последние годы предложены методы, которые дают возможность оценить авидность антител или иных рецепторов, состоящих из двух связывающих центров, соединенных гибким линкером известной длины. Таким образом, в настоящее время имеется возможность для определения авидности двухвалентных антител как в эксперименте, так и с помощью теоретических методов.*

*Ключевые слова: антитела, аффинность, авидность, ELISA.*

**В** отличие от истинной аффинности («true affinity») антител разных классов, определить которую можно при помощи разнообразных экспериментальных подходов [1–5], проблема оценки авидности («functional affinity») двухвалентных антител (и, тем более, поливалентных антител) представляется весьма непростой задачей. Она состоит в том, что эффективность связывания двухвалентных антител с поливалентным антигеном настолько велика, что в случае избытка антигена почти все антитела, имеющиеся в смеси с антигеном, после достижения состояния равновесия в данной системе являются связанными с антигеном, и свободных антител практически нет. Точнее говоря, концентрация несвязанных с антигеном антител настолько мала, что определить их концентрацию с помощью традиционно используемых методов, например, ELISA, чрезвычайно трудно, а часть антител, связавшихся с антигеном, практически равно 100%. Отсюда найти соотношение между частью связавшихся с антигеном и свободных антител бывает довольно трудно.

При теоретической оценке авидности двухвалентных антител обычно неизвестны многие параметры взаимодействия, от которых зависит эффективность связывания антител. В связи с этим исследователям приходится

делать различные допущения, которые приводят к значительной неопределенности или же неточности результатов, полученных при помощи теории. Например, часто приходится предполагать, что гибкость полипептидной цепи в шарнирном участке антител является абсолютной и поэтому Fab-фрагменты антител, содержащие активные центры распознавания антигена, согласно допущению могут абсолютно свободно двигаться вблизи Fc-фрагмента антитела на расстоянии, ограниченном только длиной полипептидной цепи в шарнирном участке [6–8]. Очевидно, что на самом деле полипептидная цепь в шарнирной области антител имеет определенную упругость и для того, чтобы ее согнуть, требуется некоторая энергия, величина которой обычно неизвестна. Следовательно, допущение об абсолютной эластичности шарнирного участка антитела может стать источником заметной ошибки в расчетах константы равновесия для двухвалентного взаимодействия, т.е. в оценке авидности антител.

В настоящей статье рассматриваются некоторые проблемы, связанные с экспериментальным измерением или же теоретической оценкой аффинности двухвалентных антител, а также обсуждаются возможные направления, которые могут позволить решить эту проблему.

### Результаты и обсуждение

Напомним, что термином «авидность», как и термином «аффинность», или «истинная аффинность», обычно обозначают степень сродства взаимодействующих молекул (например, рецептора с лигандом, антитела с антигеном). Однако термин «аффинность» применяется для моновалентного взаимодействия, а термин «авидность» для двухвалентного и более (т.е. поливалентного) взаимодействия. Очень часто вместо термина «авидность» используют также термины «функциональная аффинность», «кажущаяся аффинность», или «эффективная аффинность» [9], однако в настоящей статье мы будем в основном пользоваться термином «авидность» для обозначения двухвалентного и поливалентного взаимодействия.

Несмотря на то, что попытки оценки авидности двухвалентных антител предпринимались еще в начале 60-х годов прошлого столетия и были, как тогда считалось, успешными, однако в конце 90-х и начале 2000-х годов появилась серия статей Mattes и др. [9–12], в которых авторы анализируют данную проблему и справедливо указывают на сложности и даже на ошибки в имевшихся ранее экспериментальных попытках определить авидность двухвалентных антител. Прежде всего Mattes и др. [9–12] указывают на следующие требования, перечисленные ранее Mason и Williams (1986) [13], которые должны выполняться для того, чтобы термин «функциональная активность» был математически верным.

Для этого:

- 1) график Скотчарда должен быть линейным;
- 2) должно достигаться динамическое равновесие между связанными с антигеном и свободными антителами;
- 3) аффинность, вычисленная с помощью графика Скотчарда, должна соответствовать аффинности, вычисленной из отношения констант скорости прямой,  $k_a$ , и обратной,  $k_d$ , реакции, т.е.  $K_a = k_a/k_d$ .

Как оказалось, указанные требования обычно не соблюдаются в экспериментах по оценке авидности двухвалентных антител. Проанализировав имеющиеся экспериментальные результаты, Ong и Mattes (1993) пришли к следующим выводам. Во-первых, для концепции авидности отсутствует математическая основа. Например, в отличие от перечисленных выше требований, экспериментальные данные, полученные при изучении связывания двухвалентных антител и поливалентно-

го антигена, обработанные соответствующим образом результаты не дают линейной зависимости, т.е. нельзя получить прямой линии на графике Скотчарда [14]. Отсюда авторы сделали вывод, что применение термина «функциональная аффинность» для характеристики двухвалентного связывания антител с поливалентным антигеном является ошибочным и даже неуместным.

Во-вторых, что особенно важно, вычисляемые данные, касающиеся величины авидности, очень часто зависят от экспериментальных условий, применявшихся при попытке оценки связывания двухвалентных антител, например, от концентрации обоих реагентов или же от объема инкубационной среды [11]. На основании этого Ong и Mattes пришли к выводу, что получаемые в эксперименте оценки авидности двухвалентных антител не имеют ничего общего с их объективной характеристикой и могут быть названы скорее «псевдоаффинностью», а не авидностью или «функциональной аффинностью» [10–13].

В-третьих, во многих работах показано, что связывание двухвалентных антител с поливалентным антигеном является практически необратимым [15–18]. Это свидетельствует о том, что значение константы скорости диссоциации ( $k_d$ ) для данной реакции или близко к нулю, или же равно нулю. Отсюда следует, что отношение  $k_a/k_d$  должно стремиться к бесконечности и отыскать с помощью этого отношения величину аффинности взаимодействия, т.е. определить значение  $K_a = k_a/k_d$ , не представляется возможным.

Позднее Mattes обращает внимание на тот факт, что в подавляющем большинстве клинических исследований, в которых использовались двух- или поливалентные антитела, как правило, указывалось значение истинной аффинности, но не функциональной аффинности этих антител [12]. Как полагает автор, никакая величина не может быть использована в смысле значения функциональной аффинности антител для двухвалентного, а тем более для поливалентного связывания антител с антигеном, поскольку подобная величина только вводит в заблуждение и не дает абсолютно никакой информации об истинном процессе взаимодействия антител и поливалентного антигена.

Таким образом, на основании вышеизложенного упомянутые авторы считают, что в отличие от истинной аффинности, концепция авидности вообще не имеет под собой математической основы для описания поливалент-

ного связывания, а такую величину как avidность двухвалентных антител нет смысла даже пытаться определить. Каковы же причины того, что цитированные выше авторы весьма скептически относятся к самой идее оценки avidности двухвалентных антител с поливалентным антигеном? Чтобы понять эти причины, нам необходимо рассмотреть некоторые аспекты имеющихся различий между моновалентным и поливалентным связыванием антител с антигеном.

Вначале рассмотрим более простую задачу, а именно, как оценить константу равновесия для реакции взаимодействия двух связанных между собой рецепторов (в том числе и антител) с двумя несвязанными лигандами (в том числе с антигеном). Чтобы сделать это, напомним следующие важные моменты для стехиометрии связывания поливалентным рецептором двух и более моновалентных лигандов. Подобную реакцию можно рассматривать как реакцию последовательного, обратимого присоединения к сайтам рецептора  $n$  отдельных лигандов. Если константа равновесия каждого отдельного этапа связывания лиганда равна соответственно  $K_1, K_2 \dots K_n$ , то общая константа равновесия ( $K$ ) данной реакции равна произведению всех констант равновесия для каждого этапа, т.е.  $K = K_1 \times K_2 \dots \times K_n$ .

Важно также напомнить, что, согласно определению, константа равновесия моновалентного связывания рецептора с лигандом измеряется отношением концентрации образовавшегося комплекса ( $c$ ), к произведению концентраций свободных сайтов связывания рецептора ( $r-c$ ), и концентрации лиганда ( $l-c$ ), т.е.

$$K = \frac{c}{(l-c)(r-c)} \quad (1)$$

Из уравнения (1) видно, что размерность константы равновесия для реакции моновалентного связывания равна  $1/(\text{моль/л})$  или  $M^{-1}$ . Следовательно, для  $n$ -валентного связывания моновалентных лигандов размерность константы равновесия будет равной  $M^{-n}$ .

Теперь вернемся к рассмотрению реакции двухвалентного связывания. На рис. 1 представлена схема реакции, где два различных рецептора,  $R_1$  и  $R_2$ , объединенные в одну молекулу, связываются независимо друг от друга с соответствующими моновалентными лигандами. Если известна константа аффинности для связывания для каждого из рецепторов (например, они равны  $K_1$  и  $K_2$ ), тогда схема процесса связывания может быть представлена уравнением:

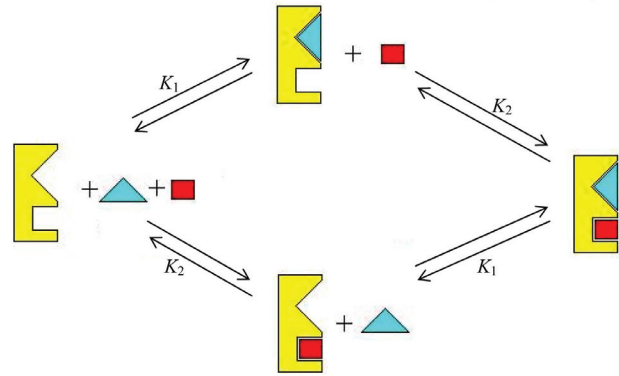


Рис. 1. Схема реакции взаимодействия двухвалентного рецептора с моновалентными лигандами (соответственно треугольник и прямоугольник). Константы аффинности взаимодействия с данными лигандами соответственно равны  $K_1$  и  $K_2$ , а константа равновесия для данной реакции —  $K = K_1 \times K_2 M^{-2}$

$$R_1 + R_2 + 2L = R_1L + R_2 + L = R_1L + R_2L, \quad (2)$$

а константа равновесия данного процесса будет равна произведению обеих констант, т.е.  $K = K_1 \times K_2$  [19–21]. Очевидно, что если  $K_1 = K_2$ , то для такого взаимодействия  $K = K_1^2 = K_2^2$ . Понятно также, что размерность константы равновесия данной реакции будет  $M^{-2}$ .

Пусть теперь те же рецепторы,  $R_1$  и  $R_2$ , жестко связанные между собой, могут взаимодействовать с теми же лигандами, которые также жестко связаны между собой. В этом случае данные структуры взаимодействуют как единое целое по принципу «все или ничего» (рис. 2). Можно показать, что в этом случае константа равновесия реакции взаимодействия объединенного рецептора с лигандом также будет равна произведению констант равновесия, свойственных для моновалентного связывания каждого из рецепторов [19–21]. Однако в подобных случаях связывание объединенного рецептора и двухвалентного лиганда есть одноразовым актом, т.е. фактически это просто моновалентное связывание, хотя и более сложных по структуре молекул. В связи с этим размерность константы равновесия такой реакции будет не  $M^{-2}$ , как это было для независимого связывания обоих лигандов и двухвалентного рецептора, а будет равной  $M^{-1}$ .

Важно подчеркнуть, что это очень существенные различия величин констант равновесия для двух рассматриваемых случаев. Во-первых, хотя в обоих случаях численное значение констант равновесия равно произ-

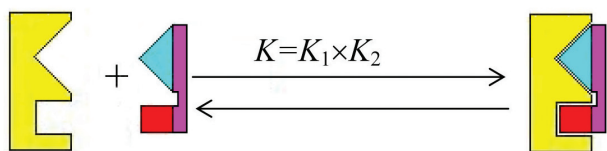


Рис. 2. Взаємодія двувалентного рецептора з відповідними лігандами, які жорстко пов'язані між собою. Константа афінності взаємодії для такої реакції дорівнює  $K = K_1 \times K_2 \text{ M}^{-1}$

веденню констант рівноваги кожного з рецепторів, т.е.  $K = K_1 \times K_2$ , порівнювати їх величини для обох розглянутих вище реакцій не представляється можливим через різницю в їх розмірності, т.к. в одному випадку розмірність дорівнює  $\text{M}^{-2}$ , а в другому —  $\text{M}^{-1}$ . Порівнювати ці величини не можна, оскільки тут ми маємо той же випадок, коли неможливо порівнювати значення, наприклад, п'ять метрів, десять грамів або п'ятнадцять секунд.

Во-вторых, підвищення ефективності зв'язування рецептора з лігандом, т.е. зсув в сторону збільшення концентрації утвореного комплексу, значительно зростає, коли взаємодія обох рецепторів з лігандом відбувається як єдине ціле порівняно з випадком, коли ліганди не пов'язані між собою. Це відбувається в зв'язі з тим, що константа швидкості реакції зв'язування жорстко об'єднаних лігандів і двувалентних рецепторів є приблизно такою ж, як і для випадку, коли ліганди не пов'язані між собою. А ось константа швидкості розпаду утвореного рецептор-лігандного комплексу багаторазово зменшується, оскільки для одночасного розриву зв'язування обох сайтів рецептора і обох лігандів потрібна енергія, рівна сумарній енергії їх зв'язування, а подавляюче число існуючих ліганд-рецепторних комплексів при фізіологічних значеннях температури такою енергією, як правило, не володіють. В зв'язі з цим реакція двувалентного рецептора з двувалентним лігандом стає практично необоротною.

Щоб продемонструвати різницю між розглянутими вище реакціями моновалентного і двувалентного ліганд-рецепторного взаємодії, має сенс розглянути практичний приклад, в якому два рецептора з даною афінністю зв'язуються з поливалентним лігандом або як незалежні молекули, або ж навпаки, коли молекули рецептора жорстко об'єднані разом,

і їх зв'язування з лігандом відбувається як одночасний процес. Ітак, припустимо, що константа рівноваги для моновалентного взаємодії кожного з рецепторів є дуже низкою і дорівнює, наприклад,  $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ . Така низка константа афінності нами вибрана спеціально для того, щоб чітко були видні різниця між реакціями одновалентного і двувалентного взаємодії. Тоді, згідно сказаному вище, для моновалентного взаємодії тих же реагентів, але в тому випадку, коли вони об'єднані в двувалентний рецептор і двувалентний ліганд, константа рівноваги буде дорівнювати  $1 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$  [22].

Кількість утвореного комплексу для обох випадків легко розрахувати, використовуючи рівняння:

$$c = \frac{lK + rK + 1 - \sqrt{(lK + rK + 1)^2 - 4lrK^2}}{2K}, \quad (3)$$

яке можна легко отримати з рівняння (1). Використовуючи рівняння (3), можна визначити, яка концентрація комплексу ліганд-рецептор і які концентрації вільних реагентів будуть отримані при досягненні рівноваги в обох розглянутих реакціях, якщо існують однакові початкові концентрації реагентів, а саме:  $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ , а їх константи рівноваги дорівнюють  $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  і  $1 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$  відповідно. Результати розрахунків концентрацій вільних реагентів і утворених комплексів для подібних реакцій представлені на рис. 3.

Як видно з малюнка, в першому випадку, коли молекули ліганда (або рецептора) не пов'язані між собою і кожен з них здатен окремо зв'язуватися з сайтами двувалентного рецептора (або ліганда), кількість утвореного комплексу невелика і становить всього близько 1% від концентрації існуючих реагентів. Прямо протилежна ситуація спостерігається, коли молекули ліганда (або рецептора) пов'язані жорстко між собою і завдяки цьому константа афінності взаємодії зростає до  $1 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ . В цьому випадку  $\approx 99\%$  реагентів утворюють комплекс, а в вільному стані знаходиться всього  $\approx 1\%$  реагентів. Зверніть увагу, що отримується абсолютно ідентична ситуація, якщо епітопи лігандів жорстко з'єднані між собою, а сайти рецепторів не пов'язані між собою.

Розглянемо ситуацію, яка більш типова для реакції взаємодії двувалентних антитіл і моновалентного або поливалентного антигену. Нехай афінність



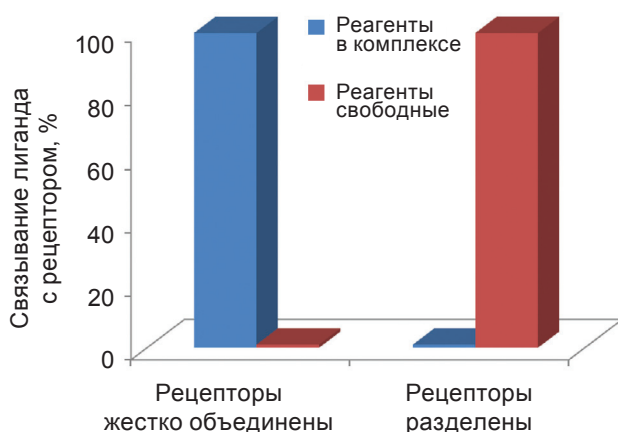


Рис. 3. Зависимость между количеством образовавшегося лиганд-рецепторного комплекса и количеством свободного рецептора при достижении равновесия в лиганд-рецепторной смеси для случаев, когда два рецептора жестко объединены в один двухвалентный рецептор или же эти рецепторы разделены. Расчеты выполнены с помощью уравнения (3) для следующих параметров лиганд-рецепторного взаимодействия:  $K_1 = K_2 = 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ;  $l = 1 \times 10^{-8} \text{ M}$ ;  $r = 1 \times 10^{-8} \text{ M}$ . В случае, когда оба рецептора жестко связаны друг с другом, аффинность их взаимодействия с двух- или поливалентным лигандом возрастает до  $K_1 = 1 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$

антител (т.е. константа моновалентного связывания) равна  $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ . В связи с тем, что паратопы антител связаны между собой не жестко, а с помощью гибкого линкера, то, согласно экспериментальным данным [23–25], авидность взаимодействия таких антител с соответствующим поливалентным антигеном численно не произведению констант аффинности каждого из паратопов, а возрастает примерно в 100–1000 раз. Таким образом, константа равновесия для двухвалентного связывания данных антител с антигеном будет достигать от  $1 \times 10^{11}$  до  $1 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ .

Таблица 1. Зависимость количества моновалентных антител, связавшихся с сорбированным на микроплате антигеном или оставшимися в растворе свободными после достижения равновесия, от количества сорбированного антигена. Расчеты сделаны с помощью уравнения (3) для антител, аффинность которых равна  $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$

Количество сорбированного антигена, моль	Исходная концентрация антител, М	Часть антител, связавшихся с антигеном	Часть антител, оставшихся свободными
$5 \times 10^{-13}$	$1 \times 10^{-10}$	83,01%	16,9%
$1 \times 10^{-12}$	$1 \times 10^{-10}$	90,8%	9,2%
$2 \times 10^{-12}$	$1 \times 10^{-10}$	95,2%	4,8%

Концентрация антител, обычно используемая в ELISA, равна около  $1 \times 10^{-10} \text{ M}$  (в 0,1 мл раствора), а количество антигена, сорбированного в одной лунке микроплат, равна примерно  $1 \times 10^{-12}$  моль, причем весь этот антиген находится в контакте с 0,1 мл раствора антител. Это значит, что данная ситуация аналогична таковой, как если бы концентрация данного антигена в 0,1 мл раствора была равна  $(1 \times 10^{-12} \text{ M})/0,0001 = 1 \times 10^{-8} \text{ M}$ . Для антител, аффинность которых равна  $K = 1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ , сделанный с помощью уравнения (3) расчет количества моновалентных антител, связавшихся с сорбированным антигеном после достижения состояния равновесия и количества несвязанных антител, оставшихся в растворе, для подобных случаев дает следующие величины (табл. 1).

Как видно из табл. 1, при указанных параметрах взаимодействия антител с антигеном и взятых для расчетов концентрациях реагентов подавляющее количество антител свяжется с антигеном. Еще больше данная реакция будет сдвинута в сторону образования комплекса антиген–антитело, если авидность антител увеличится в 100 раз и достигнет величины  $1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$  (табл. 2). При этом, как видно из таблицы, количество не связавшихся антител в данном случае обратно пропорционально количеству антигена, сорбированного на платах.

Таким образом, связывание с сорбированным антигеном двухвалентных антител, авидность которых находится в пределах  $1 \times 10^{11}$ – $1 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ , является реакцией, которую можно в первом приближении рассматривать как необратимую. Очевидно также, что в случае удаления из лунок микроплат раствора с не связавшимися антителами и его заменой тем же раствором, но без антител, даже длительная инкубация приведет к столь малой десорбции ранее связавшихся антител (будет десорбировано примерно около 0,01%), что выявить ее

Таблиця 2. Зависимость количества двухвалентных антител, связавшихся с сорбированным на микроплате антигеном или оставшимися в растворе свободными после достижения равновесия, от количества сорбированного антигена. Расчеты сделаны с помощью уравнения (3) для антител, авидность которых равна  $1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$

Количество сорбированного антигена, моль	Исходная концентрация антител, М	Часть антител, связавшихся с антигеном	Часть антител, оставшихся свободными
$5 \times 10^{-13}$	$1 \times 10^{-10}$	99,80%	0,020%
$1 \times 10^{-12}$	$1 \times 10^{-10}$	99,90%	0,010%
$2 \times 10^{-12}$	$1 \times 10^{-10}$	99,95%	0,005%

с помощью ELISA будет невозможно, хотя метод ELISA считается весьма чувствительным. Эти выводы находятся в полном соответствии с ранее полученными экспериментальными результатами многих авторов, которые обнаружили, что реакция связывания двухвалентных антител с поливалентным (или с сорбированным на платах) антигеном является практически необратимой [15–18].

Отсюда следует, что в экспериментах Ong и Mattes [10] и Mattes [9, 11, 12] по исследованию динамики диссоциации связанных с сорбированным антигеном двухвалентных антител авторы не случайно почти не выявили ее, поскольку они и не могли обнаружить заметной диссоциации антител. То, что ими была обнаружена несколько более ошутимая диссоциация антител в первые несколько часов, чем впоследствии в течение суток, видимо, было обусловлено тем, что часть антител была связана с антигеном по той или иной причине не обоими, а только одним из паратопов (рис. 4). Возможные причины такого неполного двухвалентного связывания антител с сорбированным антигеном более подробно обсуждались нами ранее [22].

Таким образом, проведенные нами расчеты показывают, что использованный Ong и Mattes метод вряд ли мог привести к экспериментальной оценке авидности двухвалентных антител, если их аффинность не являлась достаточно низкой, а была, как это бывает в большинстве случаев, близкой к  $1 \times 10^8 - 1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ . Тем не менее, это не значит, что реакция связывания двухвалентных антител с поливалентным антигеном является полностью необратимой и оценка ее авидности совершенно лишена смысла, как это утверждают цитированные авторы. Можно сделать вывод, что для экспериментальной оценки авидности антител следует использовать такие методы, чувствительность которых позволяет оценивать концентрации антител, достигающие 0,01% и меньше от их исходной концентрации, применяемой в соответствующих экспериментах. Такими методами являются, например, методы с радиоактивной меткой реагентов, или же следует применять иные методы со сходной чувствительностью.

Другое направление подобных исследований, которое может привести к оценке авидности антител, это изучение динамики

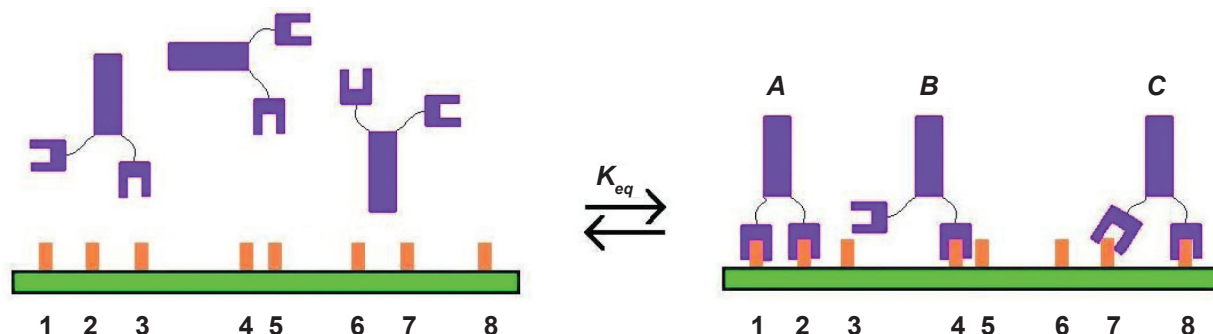


Рис. 4. Схема различных вариантов связывания двухвалентных антител с эпитопами антигена (1–8), сорбированного на платах или с эпитопами поливалентного антигена: А – полное, В – моновалентное, С – частичное двухвалентное

диссоциации антител, ранее связавшихся с поливалентным антигеном, которую можно индуцировать с помощью растворов моновалентного антигена различной концентрации. В таких экспериментах рассматриваемая реакция будет в значительной степени сдвинута в сторону связывания антител с антигеном в растворе, и благодаря этому динамика диссоциации антител с поливалентного антигена может быть легко изучена, в том числе и с помощью ELISA.

А теперь рассмотрим то, как avidность двухвалентных антител можно оценить с помощью теоретических методов, если аффинность антител заранее известна. Обычно в подобных работах используют следующий подход. Поскольку структура и размеры антител в настоящее время хорошо известны [6], то рассматриваются две последовательных реакции, в которых вначале происходит моновалентное связывание паратопа антитела и эпитопа антигена, а потом происходит связывание второго паратопа с одним из доступных эпитопов поливалентного антигена.

Рассмотрению этого вопроса посвящены многие работы [26–30], однако чаще всего в последние годы цитируют широко известную работу Crothers и Metzger (1972) [6]. В ней авторы попытались развить теоретические подходы для того, чтобы, зная аффинность исследуемых антител (т.е. константу равновесия для реакции моновалентного взаимодействия антител с антигеном), можно было оценить avidность их взаимодействия с поливалентными антигенами. Авторам удалось развить общую теорию поливалентного взаимодействия между антителами и антигенами, используя относительно несложный математический аппарат. В этой модели предполагается, что гибкость полипептидных цепей, которые связывают антигенраспознающие Fab-участки, является абсолютной. Предполагалось, что при отсутствии стерических препятствий угол между Fab-фрагментами в данной модели может варьировать от 0 до  $\pi$ .

Очевидно, что для реально существующих антител гибкость полипептидных цепей, связывающих антигенраспознающие Fab-участки, не является абсолютной, а минимальный и максимальный угол между Fab-фрагментами имеет определенное значение для каждого типа антител и не достигает величины  $\pi$ . По-видимому, по этим причинам полученные с помощью теории Crothers и Metzger (1972) оценки avidности антител являются весьма далекими от реальных. Как указывают

сами авторы в заключении упомянутой статьи, ими сделана только попытка сформулировать рациональный подход для изучения данного вопроса. Однако пока что этим путем невозможно получить точные значения констант связывания, поскольку многие параметры реакции взаимодействия антител с антигеном, в частности степень гибкости полипептидных цепей антител, связывающих Fab-участки, являются неизвестными.

В связи с этим в последние годы появилась серия работ, принадлежащих Zhou Н-Х [31–35], в которых автор попытался развить новую теорию обратимого связывания двухвалентных рецепторов и двухвалентных или поливалентных лигандов. В этой теории рассматриваются двухвалентные рецепторы, связывающие центры которых соединены гибким линкером известной длины и состоящим из известного количества аминокислотных остатков. В свою очередь, данная теория Zhou основана на иной теории, а именно на теории, описывающей поведение червеобразной полипептидной цепи в растворе [36, 37].

На основании статистической механики червеобразной полипептидной цепи Zhou получил уравнение (4), которое позволяет оценить так называемую эффективную концентрацию (в молях) второго связывающего центра двухвалентного рецептора, когда первый связывающий центр уже обратимо соединился с эпитопом поливалентного лиганда [31–33]:

$$p(d_0) = \left( \frac{3}{4\pi l_p l_c} \right)^{3/2} \times \exp\left( \frac{-3d_0^2}{4l_p l_c} \right) \times \left( 1 - \frac{5l_p}{4l_c} + \frac{2d_0^2}{l_c^2} - \frac{33d_0^4}{80l_p l_c^3} - \frac{79l_p^2}{160l_c^2} - \frac{329d_0^2 l_p}{120l_c^3} + \frac{6799d_0^4}{1600l_c^4} - \frac{3441d_0^6}{2800l_p l_c^5} + \frac{1089d_0^8}{12800l_p^2 l_c^6} \right), \quad (4)$$

где  $d_0$  – расстояние между связывающими центрами рецептора после их связывания с лигандом;  $b = 3,8 \text{ \AA}$ , т.е. это ближайшее расстояние между углеродными атомами  $C^\alpha-C^\alpha$  полипептидной цепи;  $l_p = 3 \text{ \AA}$ ;  $l_c = bL$ , где  $L$  – число аминокислотных остатков полипептид-

ной цепи линкера, связывающего сайты рецептора.

Ранее было показано [31], что константа равновесия для реакции взаимодействия рецептора с соответствующим лигандом ( $K_A$ ), при условии, что рецептор ограничен в своем движении линкером известной длины, равна

$$K_A = K_2 \times p(d_0), \quad (5)$$

где  $K_2$  — константа равновесия для реакции взаимодействия второго рецептора с лигандом для бимолекулярной реакции (т.е. когда линкер отсутствует).

Следовательно, зная величины  $K_2$  и  $p(d_0)$ , можно вычислить величину  $K_A$ . Если величина константы связывания первого рецептора и лиганда равна, например,  $K_1$ , тогда константа связывания двухвалентного рецептора, у которого сайты связывания соединены гибким линкером, будет равна:

$$K = K_1 \times K_A = K_1 \times K_2 \times p(d_0). \quad (6)$$

В том случае, если рассматривается взаимодействие не произвольно взятого рецептора, а двухвалентного антитела с поливалентным антигеном, то в этом случае, как известно, для обоих паратопов  $K_1 = K_2$ , откуда следует, что

$$K = K_1^2 \times p(d_0). \quad (7)$$

Согласно данным Zhou, разработанный им подход позволяет теоретически вычислять константу связывания двухвалентных рецепторов (у которых оба связывающих центра соединены между собой гибким линкером, т.е. полипептидной цепью) с соответствующим поливалентным лигандом, причем эти оценки, по данным авторов, хорошо согласуются с экспериментально полученными результатами [33–35].

Следует, однако, обратить внимание, что уравнение (4), дает приемлемые, проще говоря, не являющиеся абсурдными результаты, только при достаточно больших значениях  $L$ , а именно, при  $L \geq 7$ . При значениях  $L \leq 7$  уравнение (4) может давать значения  $p(d_0)$  меньше нуля. Как показывают наши расчеты с использованием уравнения (4), то, при каких именно значениях  $L$  (4, 5 или 6) получаются отрицательные величины эффективной концентрации одного из сайтов связывания рецептора,  $p(d_0)$ , зависит от величины  $d_0$  (рис. 5). Вместе с тем, очевидно, что поскольку величина  $p(d_0)$  имеет размерность моль/литр, то ее значение не может быть меньше нуля.

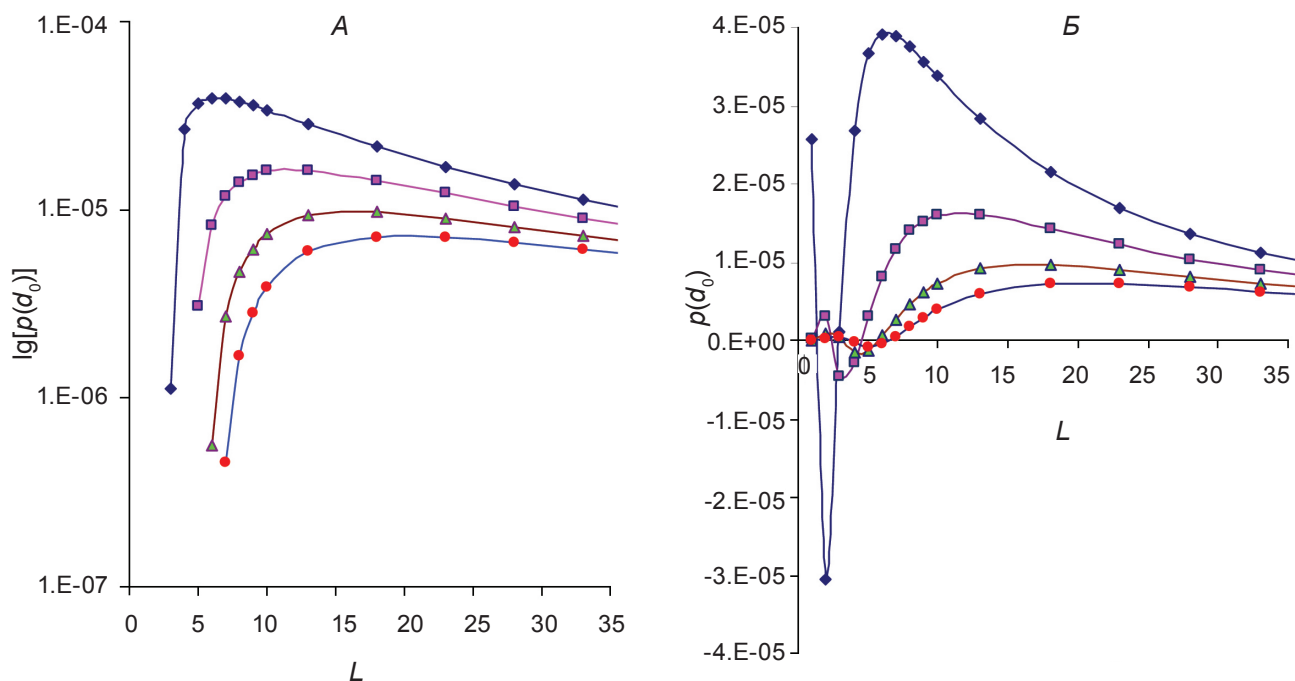


Рис. 5. Зависимость значений  $p(d_0)$  от величины  $d_0$  при постоянных значениях остальных параметров:  $b = 3,8 \text{ \AA}$ ;  $l_p = 3 \text{ \AA}$ ;  $l_c = bL$ ,  $L$  — число аминокислотных остатков полипептидной цепи линкера, связывающего сайты рецептора. Расчеты сделаны с помощью уравнения (4).  $\blacklozenge$  —  $d_0 = 3$ ,  $\blacksquare$  —  $d_0 = 17$ ,  $\blacktriangle$  —  $d_0 = 20$ ,  $\bullet$  —  $d_0 = 22$ ; А — значения  $p(d_0)$  в логарифмической шкале; Б — те же величины  $p(d_0)$ , представленные в абсолютных значениях



С чем может быть связана подобная зависимость значений  $p(d_0)$  от величины  $d_0$ ? По всей видимости, если значение  $d_0$  превосходит длину полипептидного линкера, расположенного между сайтами связывания, тогда ни при каких условиях двухвалентное взаимодействие данного бивалентного рецептора и поливалентного лиганда произойти не может, и именно этот факт приводит, по-видимому, к получению абсурдных результатов при помощи уравнения (4), т.е. к появлению отрицательных значений  $p(d_0)$ . Если это так, то рассматриваемая теория выглядит достаточно логичной, а основанный на ней подход является весьма привлекательным, поскольку позволяет решить довольно непростую задачу оценки авидности лиганд-рецепторного взаимодействия для двухвалентных рецепторов.

Отметим, что данный подход, помимо самого автора, уже начали использовать и другие исследователи [38]. Согласно их данным, рассмотренная теория позволила теоретически оценить авидность взаимодействия двухвалентных рецепторов и соответствующих лигандов. Таким образом, несмотря на все сложности, имеющиеся в решении данной проблемы, можно полагать, что как экспериментальные, так и теоретические подходы в настоящее время позволяют как в эксперименте, так и с помощью теоретических подходов оценить авидность двухвалентного связывания рецепторов (или антител) и соответствующих поливалентных лигандов (или антигенов).

### АВИДНІСТЬ ДВОВАЛЕНТНИХ АНТИТІЛ. ПРОБЛЕМИ ЇЇ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ВИЗНАЧЕННЯ І ТЕОРЕТИЧНОЇ ОЦІНКИ

*С. О. Бобровник, М. О. Демченко,  
С. В. Комісаренко*

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна  
НАН України, Київ;  
e-mail: s-bobrov@bk.ru

В статті розглянуто деякі проблеми, що зустрічаються за визначення авидності двохвалентних антитіл в експерименті або за допомогою теоретичних підходів для тих випадків, коли афінність антитіл є відомою. Показано, що для вимірювання частини двохвалентних антитіл, які залишаються вільними в їх суміші з надлишком антигену, що є необхідним для оцінки авидності, потрібно використовувати методи, чутливість яких значно перевищує

чутливість ELISA. Раніше існуючі теоретичні підходи не дозволяли оцінити звідність двохвалентних антитіл з цілої низки причин. Але в останні роки було запропоновано методи, що дають можливість оцінити звідність антитіл або інших рецепторів, які складаються із двох зв'язуючих центрів, з'єднаних між собою гнучким лінкером відомої довжини. Таким чином, зараз є всі можливості для визначення авидності двохвалентних антитіл як в експерименті, так і за допомогою теоретичних підходів.

**Ключові слова:** антитіла, афінність, авидність, ELISA.

### AVIDITY OF BIVALENT ANTIBODIES. PROBLEMS OF ITS EXPERIMENTAL DETERMINATION AND THEORETICAL EVALUATION

*S. A. Bobrovnik, M. A. Demchenko,  
S. V. Komisarenko*

Palladin Institute of Biochemistry, National  
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: s-bobrov@bk.ru

#### Summary

Some problems of experimental determination or theoretical evaluation of antibody avidity are considered. It was shown that in order to determine the fraction of nonoccupied antibodies in their mixture with the excess of the corresponding antigen which is required to estimate avidity the methods should be used which are more sensitive than ELISA. The available methods did not allow determining the avidity of bivalent antibodies because of many reasons. However, in the recent years new methods were suggested that make it possible to evaluate the avidity of bivalent antibodies and that of the receptors which consist of two binding sites connected by a flexible linker of the known length. Thus, there are all possibilities now for determining the avidity of bivalent antibodies in experiments or by theoretical methods.

**Key words:** antibodies, affinity, avidity, ELISA.

1. Friguet B., Chaffotte A. F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M. E. // *J. Immunol. Methods.* — 1985. — 77. — P. 305–319.
2. Stevens F. // *Molec. Immunol.* — 1987. — 24. — P. 1055–1060.
3. Lin S., Hsiao I. Y., Hsu S. M. // *An. Biochem.* — 1997. — 254. — P. 9–17.

4. *Goldberg M. E., Djavadi-Ohanian L.* // *Curr. Opin. Immunol.* – 1993. – **2**. – P. 278–281.
5. *Heinrich L., Tissot N., Hartmann D. J., Cohen R.* // *J. Immunol. Methods.* – 2010. – **352**. – P. 13–22.
6. *Crothers D. M., Metzger H.* // *Immunochemistry.* – 1972. – **3**. – P. 341–357.
7. *Kaufman E. N., Jain R. K.* // *Cancer Res.* – 1992. – **52**. – P. 4157–4167.
8. *Rudnick S. I., Adams G. P.* // *Cancer Biother. Radiopharm.* – 2009. – **24**. – P. 155–161.
9. *Mattes M. J.* // *J. Immunol. Methods.* – 1997. – **202**. – P. 97–101.
10. *Ong G. L., Mattes M. J.* // *Mol. Immunol.* 1993. – **16**. – P. 1455–1462.
11. *Mattes M. J.* // *Cancer Res.* – 1995. – **55** (23 Suppl). – P. 5733s–5735s.
12. *Mattes M. J.* // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2005. – **54**. – P. 513–516.
13. *Mason D. W., Williams A. F.* / *Handbook of Experimental Immunology*, 4th edition. (Ed. Weir D. M.) 1986. Blackwell Scientific, Oxford. – P. 38.
14. *Scatchard G.* // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1949. – **51**. – P. 660–672.
15. *Nygren H., Czerkinsky C., Stenberg M.* // *J. Immunol. Methods.* – 1985. – **85**. – P. 87–95.
16. *Chen Z., Sadana A.* // *Biophys Chem.* – 1996. – **57**. – P. 177–187.
17. *Бобровник С. А.* // *Укр. біохім. журн.* – 1998. – **70**, № 3. – С. 118–128.
18. *Бобровник С. А.* // *Там же.* – **70**, № 6. – С. 135–143.
19. *Берзофски Д. А., Берковер А. Дж.* / *Иммунология*. Под ред. У. Пола. – Москва: Мир, 1989. – Т. **3**. – С. 5–88.
20. *Tobita T., Oda M., Azuma T.* // *Molec. Immunol.* – 2004. – **40**. – P. 803–811.
21. *Bobrovnik S. A.* // *J. Mol. Recognition.* – 2007. – **20**. – P. 253–262.
22. *Бобровник С. А., Демченко М. А., Комисаренко С. В.* // *Укр. біохім. журн.* – 2011. – **83**, № 3. – С. 58–64.
23. *Hornick C. L., Karuch F.* // *Immunochemistry.* – 1972. – **9**. – P. 325–340.
24. *Karuch F.* // *Contemp. Top. Mol. Immunol.* – 1976. – **5**. – P. 217–228.
25. *Стьюард М.* *Структура и функции антител / Под ред. Глинна Л., Стьюарда.* – М.: Мир, 1983. – С. 113–147.
26. *Pisarchick M. L., Thompson N. L.* // *Biophys. J.* – 1990. – **5**. – P. 1235–1249.
27. *DeLisi C., Chabay R.* // *Cell. Biophys.* – 1979. – **2**. – P. 117–131.
28. *Reynolds J. A.* // *Biochemistry.* – 1979. – **2**. – P. 264–269.
29. *Sadana A., Vo-Dinh T.* // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 1997. – **67**. – P. 1–22.
30. *Waite B. A., Chang E. L.* // *J. Immunol. Methods.* – 1988. – **115**. – P. 227–238.
31. *Zhou H-X.* // *J. Am. Chem. Soc.* – 2001. – **123**. – P. 6730–6731.
32. *Zhou H-X.* // *J. Phys. Chem. B.* – 2001. – **105**. – P. 6763–6766.
33. *Zhou H-X.* // *Biochemistry.* – 2001. – **40**. – P. 15069–15073.
34. *Zhou H-X.* // *J. Mol. Biol.* – 2003. – **329**. – P. 1–8.
35. *Zhou H-X.* // *Biophys. J.* – 2006. – **91**. – P. 3170–3181.
36. *Gobush W., Yamakawa H., Stockmayer W. H., Magee W. S.* // *J. Chem. Phys.* – 1972. – **57**. – P. 2839–2843.
37. *Yamakawa H., Stockmayer W. H.* // *J. Chem. Phys.* – 1972. – **57**. – P. 2843–2854.
38. *Suh J. Y., Iwahara J., Clore G. M.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – **104**. – P. 3153–3158.

Получено 14.11.2011