

УДК 577.322.23

В.М. СИМОНОВ, Р.Л. АНИСИМОВ, С.В. ИВАНОВ\*

ООО «Международный биотехнологический центр «Генериум»», Владимирская область, Петушинский район, пос. Вольгинский, 601125

e-mail: ivanov@ibcgenerium.ru

## Использование методов поверхностного плазмонного резонанса и биослойной интерферометрии для изучения белок-белковых взаимодействий на примере фермента подтипа гликозилгидролазы (КФ 3.2.1) и специфических антител к нему

Методами поверхностного плазмонного резонанса и биослойной интерферометрии охарактеризованы два полученных ранее полноразмерных полностью человеческих антитела, обратимо связывающих активную форму фермента, принадлежащего к подтипу КФ 3.2.1, которая используется для заместительной ферментативной терапии при некоторых болезнях патологических лизосомных накоплений. Показано, что в нормальных физиологических условиях сконструированные антитела специфически связываются с антигеном ( $KD \sim 10^{-8}$  М) и быстро диссоциируют при нейтральных значениях pH в 60%-ном этиленгликоле, оставляя ферментативную активность неизменной. Разработанные антитела благодаря своим свойствам могут быть использованы в промышленности в качестве аффинного лиганда при выделении терапевтической субстанции фермента.

*Ключевые слова:* биослойная интерферометрия, болезни лизосомных накоплений, поверхностный плазмонный резонанс, BLI, SPR.

doi: 10.1016/0234-2758-2016-32-4-68-74

Классическими методами, такими как ИФА, можно полностью охарактеризовать межбелковые взаимодействия. Эти методы просты, что позволило разработать множество их вариантов для различных целей. Однако недостатки этих методов проявляются при введении в систему каких-либо меток, облегчающих детекцию. При этом само мечение может быть небезопасным (ра-

диоактивные или химически агрессивные метки) и оказывать влияние на реакцию образования межбелковых комплексов.

Самый распространенный метод мечения специфического антитела — конъюгация его с ферментом пероксидазой. Но при этом часто возникает нежелательное перекрывание сайтов связывания меченого антитела и другого белка на ан-

---

Симонов Владимир Михайлович, Анисимов Роман Львович, Иванов Сергей Валерьевич.

*Список сокращений:* Ag — антиген; AT — антитело; ИФА — иммуноферментный анализ; КЖ — культуральная жидкость; BLI — биослойная интерферометрия; BSA — бычий сывороточный альбумин; KD — константа диссоциации; PBS — фосфатно-солевой буфер; SPR — поверхностный плазмонный резонанс.

\* Автор для переписки.

тигене. Это обстоятельство существенно ограничивает применение ИФА. Другие равновесные методы анализа (скоростная седиментация, гель-фильтрация, динамическое рассеяние света) требуют длительных процедур оптимизации и характеризуются большой ошибкой измерения.

С другой стороны, в связи с растущим в последнее время спросом на высококачественные антитела с заранее заданными свойствами повышенное внимание уделяется оптимизации как традиционных гибридомных технологий, так и дисплейных методов, таких, например, как использование фагового дисплея [1, 2]. При этом главный этап, требующий оптимизации — это скрининг полученного разнообразия данных по целому набору ключевых параметров. Он позволяет более информативно и уже на ранней стадии комплексно охарактеризовать выбранные антитела-кандидаты. Так, методами поверхностного плазмонного резонанса (SPR) [3] и биослойной интерферометрии (BLI) [4] кандидаты могут быть детально охарактеризованы по сумме параметров в отличие от классического метода конечных точек (твердофазный иммуноферментный анализ), где детали механизма взаимодействия, такие как скорость реакций образования и распада комплекса, не могут быть измерены напрямую. Более того, при неизбежных для ИФА отмывках существует риск потери кандидатов, обладающих высокой скоростью диссоциации [5]. В случае SPR и BLI подобные риски минимизируются, позволяя анализировать межмолекулярные взаимодействия без дополнительной оптимизации.

Ряд заболеваний характеризуется недостатком фермента или присутствием его неактивной формы в организме. Наследственные заболевания, такие как болезни Хантера, Андерсона-Фабри и Гоше, связаны с нарушением липидного обмена, приводящим к накоплению субстратов определенных ферментов в организме [6—10]. Для лечения этих заболеваний применяется заместительная терапия, при которой в организм пациента вводится высокоочищенная рекомбинантная активная форма белка [11]. Самым известным примером применения этого метода является гормональная заместительная терапия инсулином при диабете. При этом введение рекомбинантного препарата назначается пациентам пожизненно и, следовательно, к качеству препаратов предъявляются очень жесткие требования.

Одно из таких требований — отсутствие иммуногенности, связанной с наличием следовых количеств примесей после очистки. При производстве безопасного лекарства для ферментозамести-

тельной терапии необходима эффективная система очистки препарата белка из смеси, которая была бы специфичной и полностью сохраняла бы его активность. Высокотехнологичным и хорошо себя зарекомендовавшим способом решения этой задачи оказалось создание специфического антитела, обратимо связывающего только молекулу мишени без потери ею ферментативной активности.

Цель данной работы — характеристика биохимических и кинетических параметров взаимодействия с ферментом сконструированных нами ранее кандидатов — полноразмерных антител — в процессе высокоэффективной очистки активной формы субстанции. Выбранный для этой цели метод исследования предусматривает контроль за ферментативной активностью молекулы-мишени и минимальное воздействие на ее реакционный центр, т.е. в нашем случае исключает внесение каких-либо дополнительных меток.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

**Фаговый дисплей и клоны-продуценты** полноразмерных полностью человеческих антител были получены стандартными методами генетической инженерии. Детальная процедура получения моноклональных антител описана в готовящейся патентной заявке.

**Выделение препаратов антител из КЖ** проводили методом одностадийной препаративной аффинной хроматографии с помощью системы ÄKTA Purifier UPC 10 (GE Healthcare, США) на колонке mAbSelect Sure 20 мл (GE Healthcare) с дальнейшим переводом в буфер готовой формы (фосфатно-солевой буфер, PBS) на колонке HiPrep Desalting 26/10 (GE Healthcare) согласно рекомендациям производителя. Очищенные препараты хранили при 4°.

**Кинетические константы определяли методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и биослойной интерферометрии (BLI)**, используя приборы Biacore T200 (GE Healthcare, США), и OCTET QK<sup>e</sup> (PALF Life Sciences), соответственно, согласно рекомендациям производителей. Так, концентрация аналита (активной формы фермента гликозилгидролазы) варьировала от 900 до 1 нМ. Стандартным буфером для SPR являлся HBS-EP+ (20 mM Na-HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,005%-ный твин-20, pH 7,4); для BLI — PBSTB (10 mM Na-фосфат, 150 mM NaCl, 0,005%-ный твин-20, 0,01%-ный BSA, pH 7,4). В качестве буфера для регенерации сенсоров был использован 0,1 M GlyHCl, pH 2,0. Буфер для специфической элюции аналита содержал 50 mM ацетат аммония,

pH 6,0, и 60%-ный этиленгликоль. Измерения проводили на панели сенсоров от производителей приборов (CM5 для SPR, AR2G или ProA для BLI), используя очищенные препараты как активного фермента для заместительной терапии, так и разработанных антител.

**Ковалентная иммобилизация антител на сорбенте.** Антитела были химически иммобилизованы на CNBr-активированной сефарозе (GE) согласно инструкции производителя.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

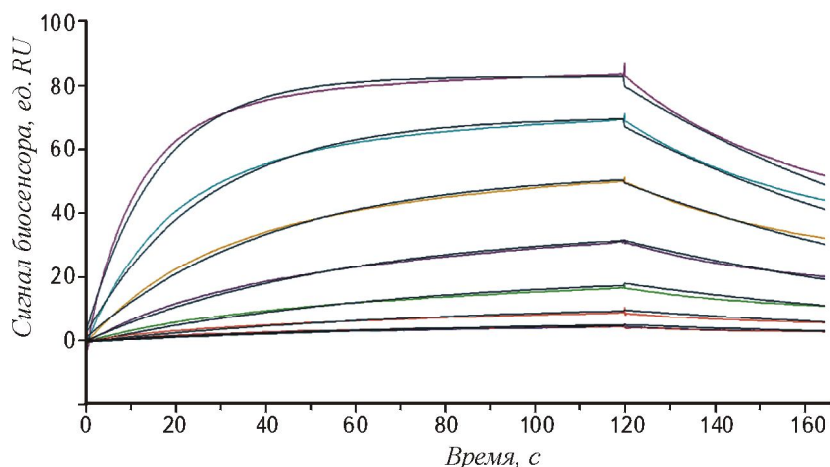
### Определение кинетических констант связывания и диссоциации

Основным параметром, характеризующим силу межмолекулярного взаимодействия в обратимых реакциях, является константа диссоциации

( $KD$ ). Этот параметр в простых случаях (для реакций первого порядка) является отношением скорости распада ( $k_d$  или  $k_{off}$ ) и скорости образования ( $k_a$  или  $k_{on}$ ) комплекса.

Используя различные подходы в выборе белка, размещаемого на сенсоре (аналог твердой фазы для ИФА), мы подобрали условия для высокопроизводительной характеристики препаратов антител. Так, в случае нековалентной ориентированной иммобилизации антитела на сенсоре CM5 через ковалентно иммобилизованные антитела, узнающие F<sub>c</sub>-фрагмент антитела человека (GE Healthcare), были получены данные о кинетике связывания с антигеном для AT1 (одного из полученных авторами антител) (рис. 1).

Кинетические константы скорости реакций для модели взаимодействия в бимолекулярном комплексе со стехиометрическим соотношением 1:1 были определены с использованием программы BiaEvaluation (GE Healthcare). Применен под-

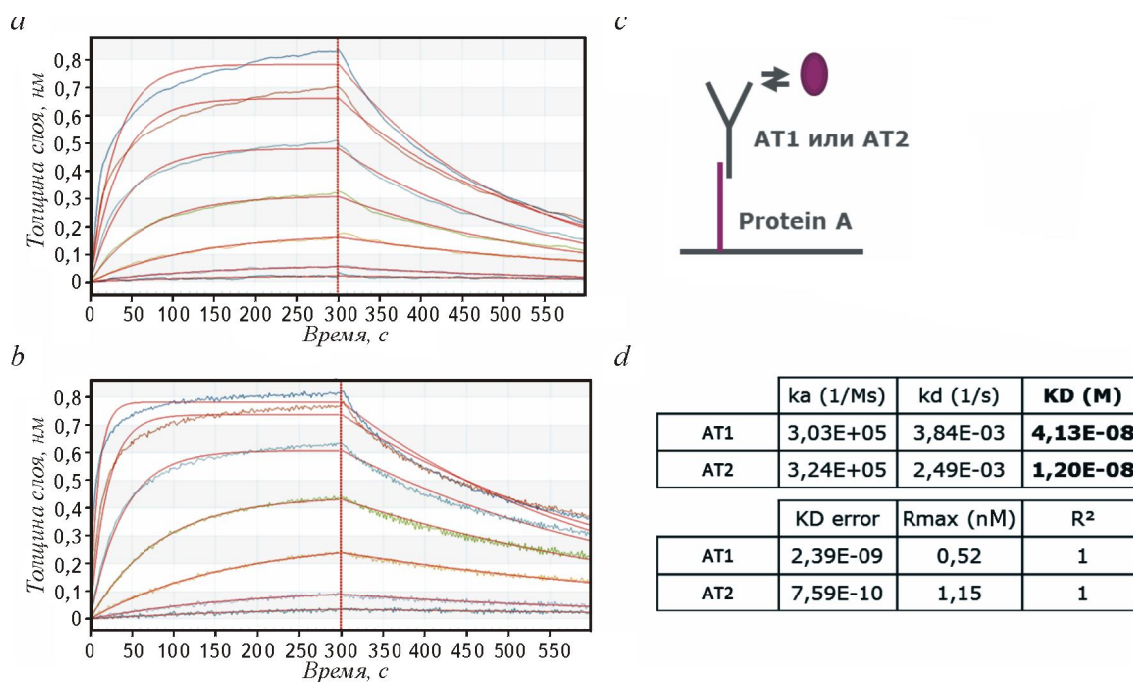


$$KD = \frac{k_d}{k_a}$$

| $k_a$ (1/Ms) | $k_d$ (1/s) | <b>KD (M)</b>   | Rmax (RU) | Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> ) | U-value |
|--------------|-------------|-----------------|-----------|-------------------------------------|---------|
| 1,42E+05     | 1,10E-02    | <b>7,71E-08</b> | 96,92     | 0,826                               | 1       |

**Рис. 1.** Сенсограммы, полученные методом SPR на Biacore T200 и показывающие накопление комплекса AT-Ag. Цветные кривые отражают экспериментальную зависимость количества образованного комплекса от концентрации Ag. Черные кривые — теоретически предсказанные сенсограммы при взаимодействии AT с Ag в соотношении 1:1. Ag использовали в серийных двукратных разведениях начиная с 300 нМ при постоянном количестве AT1 (кривые расположены сверху вниз). В таблице представлены вычисленные значения скорости ассоциации ( $k_a$ ), скорости диссоциации ( $k_d$ ) и константы диссоциации ( $KD$ ), а также вычисленное значение максимально возможного количества образованного комплекса ( $Rmax$ ) и квадратичское отклонение экспериментальных данных от модельных ( $Chi^2$ ). Значение  $U$  — параметр, дополнительно характеризующий однозначность вычисленных значений  $k_a$ ,  $k_d$  и  $Rmax$

**Fig. 1.** Sensigrams obtained by SPR on Biacore T200 demonstrating the accumulation of the AT-Ag complex. Color curves show the experimental dependencies of amount of the formed complex on Ag concentration. Black curves demonstrate the theoretically predicted dependencies at the AT-Ag ratio equal to 1:1. Ag was twofold diluted in series beginning from 300 nM with constant AT amount (curves from top to bottom). Table contains calculated values of association rate ( $k_a$ ), dissociation rate ( $k_d$ ), and dissociation constant ( $KD$ ) along with calculated value of maximum possible amount of formed complex ( $Rmax$ ) and square deviation of experimental from theoretical data ( $Chi^2$ ).  $U$ -value is a parameter that additionally confirms the unambiguity of the calculated  $k_a$ ,  $k_d$  and  $Rmax$  values



**Рис. 2.** Сенсограммы накопления комплексов АТ1-Аг (а) или АТ2-Аг (б), полученные методом BLI на OCTET QK<sup>с</sup>. Синие кривые представляют экспериментальную зависимость количества образованного комплекса от концентрации Аг. Красные кривые — теоретически предсказанные сенсограммы при взаимодействии АТ с Аг в соотношении 1:1. Аг использовали в серийных двукратных разведениях начиная с 900 нМ при постоянном количестве АТ (кривые расположены сверху вниз). с — схема нековалентной ориентированной иммобилизации АТ на поверхности сенсора. d — вычисленные константы скорости ассоциации ( $k_a$ ) и диссоциации ( $k_d$ ), константа диссоциации  $KD$ , погрешность ее вычисления ( $KD$  error), вычисленные значения максимально возможного количества образованных комплексов ( $Rmax$ ) и статистический параметр коэффициента детерминации ( $R^2$ )

**Fig. 2.** Sensigrams of accumulation of the AT1-Ag (a) and AT2-Ag (b) complexes obtained by BLI on Octet QK<sup>c</sup>. Blue curves represent the experimental dependency of amounts of formed complexes on Ag concentration. Red curves are theoretically predicted sensigrams at the AT-Ag ratio equal to 1:1. Ag was twofold diluted in series beginning from 900 nM with constant AT amounts (curves from top to bottom). Panel c represents a scheme of noncovalent oriented AT immobilization on the sensor surface. Panel d shows the calculated constants of association rate ( $k_a$ ) and dissociation rate ( $k_d$ ), dissociation constant ( $KD$ ), error of its calculation ( $KD$  error), counted values of maximum possible amount of formed complexes ( $Rmax$ ) and a statistic parameter of determination coefficient ( $R^2$ )

ход двойного вычитания фона и возможных неспецифических взаимодействий. Показано, что ход экспериментальных сенсограмм (цветные) хорошо согласуется с ходом теоретических (черные) (см. рис. 1). Однако несмотря на высокую чувствительность пропускная способность данного метода ограничена одновременным определением всего одного образца агнигента с агнигеном в одной концентрации. Более того, данный метод малоэффективен в случае использования неочищенных препаратов. Поэтому для дальнейшей характеристики разработанных антител был выбран метод биослойной интерферометрии на приборе Octet QK<sup>с</sup>. Этот метод позволяет проводить до восьми параллельных измерений, в том числе непосредственно в культуральных супернатантах. Для этого использовали коммерчески доступные сенсоры с иммобилизованным белком А. На рис. 2 представлены сенсограммы, полученные с по-

мощью BLI, а также вычисленные константы для препаратов АТ1 и АТ2.

Кинетические константы скорости реакций определены для модели взаимодействия 1:1 с помощью программы ForteBio data analysis (PALL Life Sciences). Для ускорения измерений использован подход простого вычитания фона. Как видно из экспериментальных сенсограмм, полученных для АТ1, наблюдается слабое фоновое неспецифическое взаимодействие антигена с антителом по другому сайту связывания, на которое указывает расхождение данных по константам скорости реакций, полученных в эксперименте и на модели при высоких концентрациях аналита (см. рис. 2, а). Тем не менее, теоретическая модель хорошо согласуется с экспериментом.

Различие в значениях  $KD$ , полученных методом SPR и BLI, может быть объяснено неспецифическими взаимодействиями BSA с сенсорами.

Тем не менее, для скрининга и поиска лучшего кандидата такое расхождение допустимо.

Методом BLI были аналогично определены кинетические константы для разработанного АТ2 (см. рис. 2, *b*). При этом замечено, что при одном и том же количестве иммобилизованного лиганда и аналита концентрация образованного комплекса ( $R_{max}$ ) для АТ2 выше, чем для АТ1. Модель взаимодействия 1:1 для АТ2 также точно описывает экспериментальные наблюдения.

### Определение возможности прямой неориентированной ковалентной иммобилизации разработанных антител на твердой фазе

Методом BLI исследовали многоцикловую обратимую специфическую сорбцию полученных антител с целью оценки активности их специфического связывания после ковалентной неориентированной иммобилизации с антигеном на сенсоре. Для этого в параллельных экспериментах были иммобилизованы по два сенсора с каждым антителом, и процесс накопления комплекса антитела с антигеном наблюдали в течение 50 циклов сорбции/десорбции антигена в условиях, благоприятных для сохранения ферментативной активности аналита. Полученный набор данных свидетельствует о практически неизменном уровне актив-

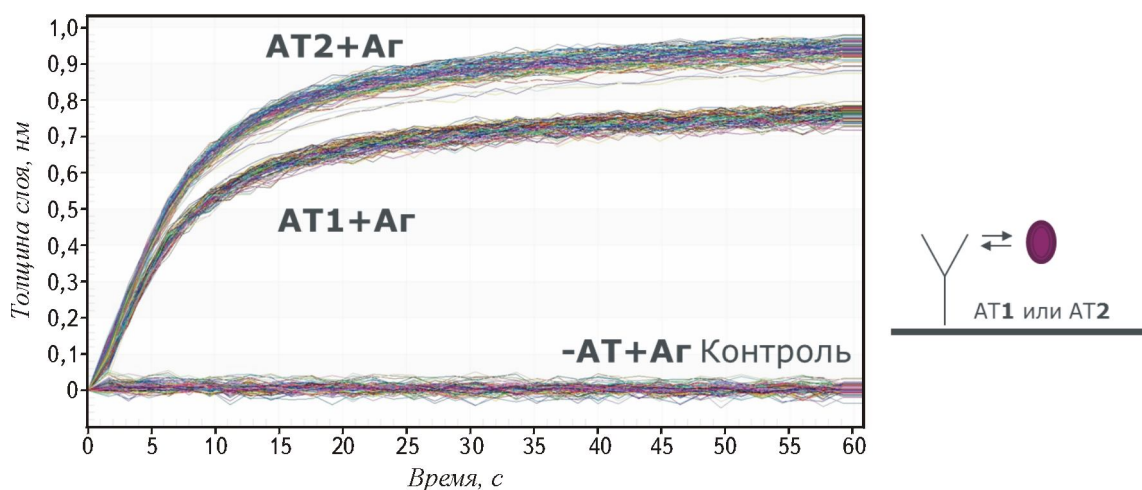
ности разработанных антител по отношению к антигену (рис. 3).

### Определение конкурентного связывания сконструированных антител на антигене

Так как полученные АТ1 и АТ2 продемонстрировали сходные биохимические и кинетические свойства, возник вопрос о возможном перекрывании сайтов их узнавания на антигене. Для исследования этого предположения был использован метод BLI в формате ковалентной неориентированной иммобилизации АТ1 или АТ2. Наблюдали за образованием и диссоциацией комплекса иммобилизованного антитела с антигеном в присутствии насыщающих концентраций либо тех же, либо конкурирующих антител, либо буфера с антигеном, но без антител (контроль). Схема эксперимента представлена на рис. 4.

В результате получили набор схожих сенсограмм (рис. 5), из которых был сделан вывод о полном перекрывании указанных сайтов связывания.

Следующим ключевым вопросом являлось подтверждение возможности использования полученных антител в качестве аффинного сорбента. Для этого антитела были химически иммобилизованы на активированном сорбенте (CNBr). После этого с помощью полученного сорбента была в одну стадию выделена полностью активная фор-



**Рис.3.** Образование на сенсорах комплекса антигена с соответствующими антителами по данным BLI (данные 50 циклов в двух повторностях). В связи с особенностями программного обеспечения и оптическими свойствами буфера для элюции антигена сенсограммы регенерации не показаны

**Fig. 3.** Formation of antigen complex with corresponding antibodies measured by BLI. Data of 50 cycles in duplicate are represented. Due to software features and optical characteristics of the antigen elution buffer, regeneration sensigrams are not shown



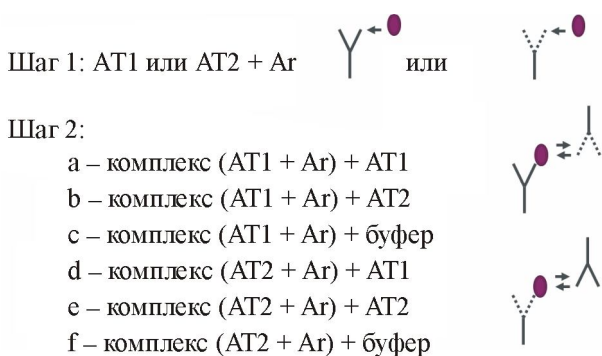


Рис. 4. Принципиальная схема опыта по определению перекрытия сайтов связывания АТ1 и АТ2 на антигене

Fig. 4. A scheme for experimental detection of overlapping of AT1- and AT2-binding sites on the antigen

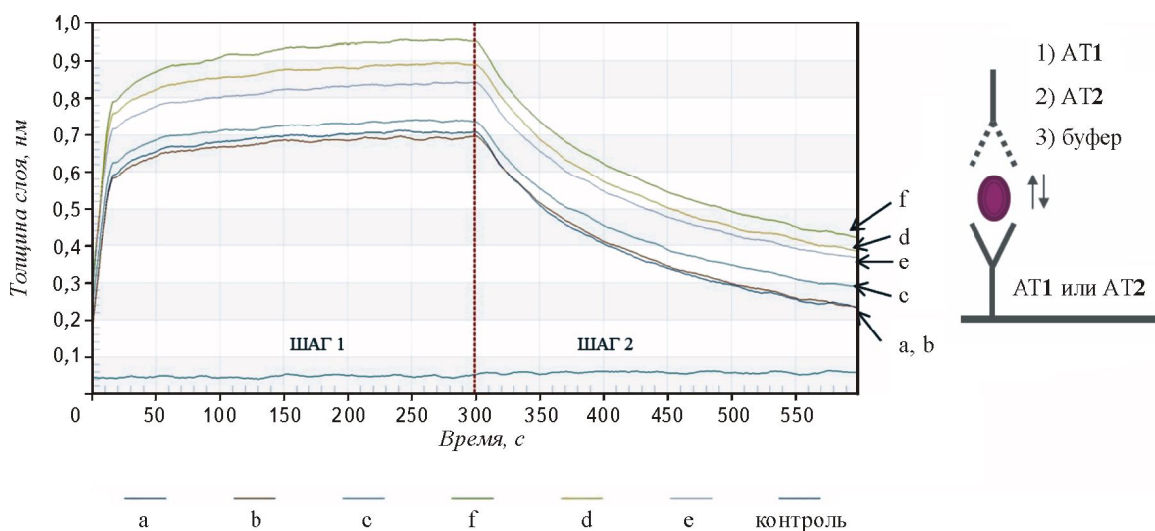


Рис. 5. Сенсограммы, полученные в эксперименте по определению перекрытия сайтов связывания антител на антигене. Отсутствие образования тройственных комплексов АТ1-Аг-АТ2 (направленных вверх кривых в рамках шага 2) говорит о полном перекрытии сайтов связывания антител на антигене а—е — см. рис. 4

Fig. 5. Sensigrams that reflect overlapping of antibody-binding sites on antigen. Lack of triple complexes AT1-Ag-AT2 (absence of the upward trend in curves within the step 2 frames) testifies to the complete overlapping of antibody-binding sites on the antigen a—e — see Fig. 4

ма фермента для заместительной терапии. Чистота полученного препарата была не ниже 90% (данные не приведены).

Таким образом, нами была разработана простая экспресс-платформа для исследования свойств моноклональных антител с целью их последующего использования для определенных заранее заданных целей. По сравнению с классическим ИФА применение этой платформы значительно ускоряет и упрощает процедуру скрининга, давая при этом значительно больше информации. Более того, данный подход позволяет моделировать поведение иммобилизованных антител по отношению к антигену на гранулах аффинного сорбента, что существенно ускоряет процесс его разработки.

Получено 07.07.16

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *McCafferty, J.* Application of phage display to high throughput antibody generation and characterization / D. Schofield, A. Pope, V. Clementel, J. Buckell, S. Chapple, K. Clarke, J. Conquer, A. Crofts, S. Crowther, M. Dyson, G. Flack, G. Griffin, Y. Hooks, W. Howat, A. Kolb-Kokocinski, S. Kunze, C. Martin, G. Maslen, J. Mitchell, M. O'Sullivan, R. Perera, W. Roake, S. Shadbolt, K. Vincent, A. Warford, W. Wilson, J. Xie, J. Young, J. McCafferty // *Genome Biol.* — 2007. — V. 8. — N 11. — P. R254—R254.18.
2. *Jijakli, K.* The *in vitro* selection world / K. Jijakli, B. Khraiwesh, W. Fu, L. Luo, A. Alzahmi, J. Koussa, A. Chaiboonchoe, S. Kirmizialtin, L. Yen, K. Salehi-Ashtiani // *Methods.* — 2016. — P. 3—13.
3. *Rich, R. L.* Higher-throughput, label-free, real-time molecular interaction analysis / R. Rich, D. Myszkowski // *Analyt. Biochem.* — 2007. — V. 361 — P. 1—6.

4. *Abdiche, Y.* Determining kinetics and affinities of protein interactions using a parallel real-time label-free biosensor, the Octet / Y. Abdiche, D. Malashock, A. Pinkerton, J. Pons // *Analyt. Biochem.* — 2008. — V. 377 — P. 209—217.
5. *Вюнше, Х.* Высокоэффективные системы для безмаркерного анализа белка / Х. Вюнше, Д. Зиверс // *Фармац. техн. хол. упаковка.* — 2014. — № 6. — С. 34—36.  
*Vunche, H.,* High-throughput systems for label-free protein analysis / H. Vunche and D. Zivers // *Farmatsevtika, Tekhnologiya i Upakovka (Pharmaceutics, Techniques and Packaging.* — 2014. — N 6. — P. 34—36).
6. *Warnock, D.G.* Renal outcomes of agalsidase beta treatment for Fabry disease: role of proteinuria and timing of treatment initiation / D. Warnock, A. Ortiz, M. Mauer, G. Linthorst, J. Oliveira, A. Serra, L. Marydi, R. Mignani, B. Vujkovic, D. Beitner-Johnson, R. Lemay, J. Cole, E. Svarstad, S. Waldek, D. Germain, C. Wanner // *Nephrol. Dial. Transplant.* — 2012. — V. 27 — P. 1042—1049.
7. *Wilcox, W.R.* Anti- $\alpha$ -galactosidase A antibody response to agalsidase beta treatment: Data from the Fabry Registry/ W. Wilcox, G. Linthorst, D. Germain, U. Feldt-Rasmussen, S. Waldek, S. Richards, D. Beitner-Johnson, M. Cizmarik, J. A. Cole, W. King, D. Warnock // *Mol. Genet. Metabolism.* — 2012. — V. 105 — P. 443—449.
8. *Weinreb, N.J.* Effectiveness of enzyme replacement therapy in 1028 patients with type 1 Gaucher disease after 2 to 5 years of treatment: a report from the Gaucher Registry/ N. Weinreb, J. Charrow, H. Andersson, P. Kaplan, E. Kolodny, P. Mistry, G. Pastores, B. Rosenbloom, C. Scott, R. Wappner, A. Zimran // *Am. J. Med.* — 2002. — V. 113. — N 2. — P. 112—119.
9. *Mistry, P.K.* Osteopenia in Gaucher disease develops early in life: response to imiglucerase enzyme therapy in children, adolescents and adults / P. Mistry, N. Weinreb, P. Kaplan, J. Cole, A. Gwosdow, T. Hangartner // *Blood Cells Mol. Dis.* — 2011. — V. 46. — N 1. — P. 66—72.
10. *Muenzer, J.* The role of enzyme replacement therapy in severe Hunter syndrome — an expert panel consensus / J. Muenzer, O. Bodamer, B. Burton, L. Clarke, G. Frenking, R. Giuliani, S. Jones, M. Rojas, M. Scarpa, M. Beck, P. Harmat // *Eur. J. Pediatr.* — 2012. — V. 171 — P. 181—188.
11. *Ratko, T.A.* Enzyme-Replacement Therapies for Lysosomal Storage Diseases / T. Ratko, A. Marbella, S. Godfrey and N. Aronson // *Technical. Briefs.* — 2013. — N 12. — P. 1—107.

V.M. SIMONOV, R.L. ANISIMOV and S.V. IVANOV\*

The International Biotechnology Center *Generium* LLC, Volgin-sky settl., Petushinskii region, Vladimirskaya oblast, 601125 Russia

*e-mail* : ivanov@ibcgenerium.ru

### Application of Surface Plasmon Resonance and Biolayer Interferometry to Investigation of Protein-Protein Interactions using Glycosyl Hydrolase Enzyme (EC 3.2.1) and Specific Antibodies to it

Two fully human monoclonal antibodies previously designed by the authors and capable of reversibly binding to the active form of the enzyme of the EC. 3.2.1 subtype have been characterized by surface plasmon resonance and biolayer interferometry methods. This enzyme is used in the replacement therapy of some lysosomal storage diseases. It was shown that under normal physiological conditions, the previously designed MAbs specifically bound to the antigen with  $KD \sim 10^{-8}$  M and rapidly dissociated in the occurrence of 60% ethylene glycol at neutral pH with the specific enzyme activity preserved. These particular properties of the constructed antibodies make them helpful as an affinity ligand during the large-scale isolation of the enzyme therapeutic substance.

*Key words:* biolayer interferometry, BLI, lysosomal storage disease, surface plasmon resonance, SPR.

*Biotekhnologiya (Biotechnology), 2016, V. 32, N 4, P. 68—74.*

---

\* Author for correspondence.