

Г. А. Кратасюк, Л. З. Якубов, В. В. Синицын, С. П. Домогатский,  
О. В. Рохлин, С. В. Кольцова, Н. А. Быняева, З. Д. Федорова,  
Г. В. Самсонов

## МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА ДЛЯ ОДНОСТАДИЙНОГО ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКООЧИЩЕННОЙ УРОКИНАЗЫ

*С помощью специально разработанной схемы скрининга получены высокоаффинные и специфичные моноклональные антитела к человеческой урокиназе. На их основе создан иммуносорбент для одностадийного выделения очищенной урокиназы из мочи.*

**Введение.** Важную роль в фибринолитическом механизме удаления тромбов играют активаторы плазминогена — специфические сериновые протеазы, — превращающие плазминоген (широко распространенный в крови и тканях зимоген) в плазмин. Плазмин — протеаза с широкой трипсиноподобной субстратной специфичностью, которая и осуществляет фибринолизис. Одним из активаторов плазминогена человека является урокиназа [1]. Клинические испытания показали, что урокиназа успешно стимулирует рассасывание тромбов *in vivo*, в связи с чем она применяется при лечении тромбозов [2]. Однако широкому ее использованию в клинической практике препятствует высокая стоимость препарата, связанная со сложностью промышленной процедуры выделения и очистки фермента. Основным источником урокиназы сейчас является человеческая моча, где фермент содержится в низкой концентрации (1 нмоль/л). Его выделяют с помощью серии ионообменных и гидрофобных хроматографий и гель-фильтрации [3—6]. При этом процедура является достаточно сложной и не позволяет получать фермент с высоким выходом. Исследования последних лет показали, что в целом ряде случаев для выделения и очистки белков можно использовать сорбенты с иммобилизованными антителами. В связи с этим представляется весьма перспективной и актуальной разработка метода и технологии выделения высокоочищенной урокиназы на иммуносорбентах с моноклональными антителами к ферменту. Следует отметить, что низкое содержание антигена в исходном материале (урокиназы в моче) и высокая концентрация других органических веществ, способных блокировать биоспецифические сорбенты, делает задачу их получения не тривиальной.

В настоящей работе, используя специально разработанный метод скрининга гибридных клонов, были получены высокоаффинные и специфичные моноклональные антитела к урокиназе человека. На основе иммуносорбентов с данными антителами предложен метод одностадийного получения высокоочищенной урокиназы из мочи.

**Материалы и методы.** Урокиназа человека («Calbiochem», США; «Sigma», США), плазминоген человека («Sigma»), фибриноген бычий (СССР, Каунас, предприятие по производству бактериальных препаратов), тромбин человека («Sigma»), трипсин бычий («Merck», ФРГ), химотрипсин человека («Sigma»), эластаза свиньи («Sigma»), хромогенный субстрат для плазмина D-Val-Leu-Lys-pNa·2HCl («Serva», ФРГ), хромогенный субстрат для урокиназы Glu-Gly-Arg-pNa·2HCl («Serva»), сефароза CL-4B («Pharmacia», Швеция). Прочие реактивы имели квалификацию не ниже «химически чистый».

Получение частично очищенного препарата урокиназы. Частично очищенный препарат урокиназы с активностью 20000 ед. Плуга на 1 мг белка был получен последовательной гель-хроматографической очисткой на ультрагелях АсА-44 и АсА-54 и сефадексе G-25 препарата урокиназы, выделенного из депигментированной мочи по методу [6] с использованием высокопроницаемого катионита биокарб-Т. Полученный препарат урокиназы использован в данной работе для иммунизации мышей.

Иммунизация и слияние. Мышам линии *Balb/c* были проведены три еженедельные подкожные инъекции урокиназы из расчета 30 мкг фермента на мышь.

Первую иммунизацию осуществляли в полном адьюванте Фрейнда, вторую и третью — в неполном. Четвертую иммунизацию проводили внутрибрюшинным введением 50 мкг урокиназы в физиологическом растворе за трое суток до гибридизации. Для гибридизации брали селезенки двух мышей. Слияние и клонирование проводили, как описано ранее [7], с использованием предварительной очистки спленоцитов в перколе [8]. Из посеянных 600 ячеек гибридные клоны были идентифицированы в 490 ячейках, культуральные среды из которых и были проверены на наличие специфических антител к урокиназе.

Отбор клонов, производящих антитела к урокиназе. Для выявления антител к урокиназе в культуральных средах проводили двухэтапный скрининг: 1) радиоиммунный анализ и 2) «функциональный» тест.

1. Препарат урокиназы («Sigma», 10 мкг/мл) сорбировали на полистирол в ячейках планшетов Microtest («Linbro», США). Затем планшеты промывали 10 мМ фосфатным буфером, рН 7,4, содержащим 150 мМ NaCl и 0,05%-ный твин-20 (раствор А), после чего заполняли тем же буфером и выдерживали в течение 30 мин при комнатной температуре для блокирования свободных мест адсорбционного связывания на пластике. В ячейки с сорбированной урокиназой вносили по 0,1 мл исследуемого образца и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Несвязавшийся белок отмывали раствором А. Специфично связавшийся антитела выявляли с помощью меченных радиоактивным иодом-125 кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши.

2. Положительные по радиоиммунному тесту культуральные среды испытывали на способность содержащихся в них антител связывать урокиназу из мочи. Для этого по 0,3 мл культуральных сред пропускали через микроколонки с иммобилизованными кроличьими антителами против иммуноглобулинов мыши (0,025 мл сефарозы с 0,1 мг антител). Затем колонки промывали раствором А, пропускали через них 3 мл мочи (~10 ед. Плуога/мл) и определяли активность урокиназы в моче, прошедшей через колонку. Ответ считали положительным, если в моче на выходе из колонки оставалось не более 20 % исходной урокиназной активности. Образцы, пропущенные через сорбенты с суммарной фракцией иммуноглобулинов мыши (отрицательный контроль), содержали не менее 90 % исходной урокиназной активности.

Классы и подклассы антиурокиназных иммуноглобулинов определяли в реакции торможения иммуносорбции с помощью радиоактивно меченных подкласс-специфичных поликлональных кроличьих антител [7].

Определение активности урокиназы. Используя в качестве стандарта урокиназу «Calbiochem», активность исследуемых образцов определяли с помощью а) фибриновых пластинок, содержащих плазминоген [9]; б) хромогенного субстрата плазмина D-Val-Lcu-Lys-pNa [10]; в) хромогенного субстрата урокиназы Glu-Gly-Arg-pNa [11]. Ингибирование активности урокиназы моноклональными антителами изучали как на фибриновых пластинках, так и с использованием хромогенных субстратов. В первом случае антитела добавляли в раствор фибриногена до полимеризации, во втором — в реакционную смесь.

Электрофорез и изоэлектрофокусирование. Электрофорез в присутствии DS-Na проводили в пластинках градиентного (от 5 до 10 %) полиакриламидного геля (ПААГ) в буферной системе Лаемли [12]. Гели либо окрашивали кумасси бриллиантовым R-250, либо после отмывки DS-Na фосфатным буферным раствором с 0,1 % тритона X-100 использовали для получения зимограмм по методу [13].

Аналитическое изоэлектрофокусирование проводили в 4 %-ном ПААГ в присутствии 6 М мочевины и 0,1 % тритона X-100 в интервале рН 3—10 на установке Мультифор («LKB», Швеция). Гели окрашивали кумасси бриллиантовым R-250 после отмывки амфолинов, согласно инструкции фирмы.

Прочие процедуры. Определение концентрации белка проводили спектрофотометрически, считая, что 1 %-ные растворы иммуноглобулинов и урокиназы при 280 нм имеют коэффициент экстинкции  $E=14$ .

Одностадийное выделение урокиназы из человеческой мочи на иммуносорбентах. В свежеполученной моче рН доводили до 8,6, добавляя 5 М NaOH, образовавшийся осадок отстаивали в течение 30 мин. Супернатант титровали до рН 7,0 1 М соляной кислотой и пропускали через иммуносорбент — сефароза CL-4B с ковалентно пришитыми моноклональными антителами против урокиназы (2 мг антител на 1 мл геля). Сорбент промывали 10 мМ фосфатным буферным раствором, рН 7,4, содержащим 0,5 М NaCl и 0,1 % тритона X-100. Элюцию урокиназы проводили 0,2 М раствором глицина, рН 2,5.

**Результаты и обсуждение.** Иммунизацию мышей урокиназой и гибридизацию проводили по обычно применяющейся схеме (см. «Материалы и методы»). Полученные гибридные клетки рассевали в ячейки планшета Microtest («Linbro»). Всего было засеяно 600 ячеек, рост гибридных клеток наблюдался в 490 ячейках. Свойства моноклональных антител во многом зависят от схемы скрининга, примененной для отбора гибридом, которую следует строить таким образом, чтобы в нее были включены факторы отбора, способствующие селекции клонов, производящих антитела с необходимым набором свойств. В данном

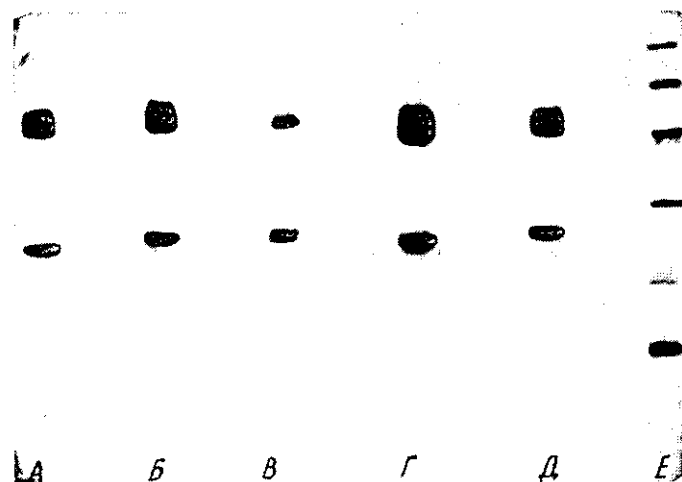


Рис. 1. Электрофорез моноклональных антител к урокиназе: а — UIG-1; б — UIG-2; в — UIG-3; г — UNG-4; д — UNG-5; е — стандарты молекулярной массы 97000; 68000; 47000; 25000; 17000; 14000

Fig. 1. SDS electrophoresis of monoclonal antibodies against urokinase: а — UIG-1; б — UIG-2; в — UIG-3; г — UNG-4; д — UNG-5; е — molecular weight standards: 97000; 68000; 47000; 25000; 17000; 14000

случае для исследования культуральных сред гибридом применяли двухэтапный скрининг, специально адаптированный для выявления высокоаффинных и специфичных антител, способных в составе иммуносорбента эффективно и избирательно сорбировать урокиназу из разбавленных многокомпонентных белковых растворов (например, мочи). Культуральные среды гибридом, ответившие положительно при обычном радиоиммунном анализе на планшетах, пропускали через микроколонки, аффинно связывающие мышинные иммуноглобулины. Полученные таким образом «двухслойные» сорбенты проверяли на способность связывать урокиназу непосредственно из мочи. Если культуральные среды гибридом содержали антитела к урокиназе, то в моче, прошедшей через «двухслойный» сорбент, падала активность урокиназы. Введение второго теста позволило существенно сократить объем работ по культивированию гибридом и клонировать только те популяции гибридных клеток, которые производили антитела, удовлетворявшие поставленной задаче. Так, из 490 первичных популяций, культуральные среды которых были исследованы радиоиммунным тестом, положительно ответивших было 48. Из них по результатам второго теста были отобраны девять популяций, которые и были клонированы. В результате получены пять независимых (происходящих из разных первичных популяций) клонов, производящих высокоаффинные и специфичные антитела против человеческой урокиназы, связывающиеся как с высоко-, так и с низкомолекулярными формами фермента. Все клоны были размножены в виде асцитных опухолей в мышах линии *Balb/c*, а антитела из асцитных жидкостей были очищены высаливанием 18 %-ным сульфатом натрия и последующей хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе. Результаты электрофореза и изоэлектрофокусирования (рис. 1, 2) сви-

детельствуют о том, что получены гомогенные препараты пяти различных антител. Все они относятся к IgG1 подклассу иммуноглобулинов. Антитела UIG-1, UIG-2 и UIG-3 ингибируют активность урокиназы как в тесте на фибриновых пластинках, так и с хромогенным субстратом плазмина D-Val-Leu-Lys-pNa (рис. 3, 4). Амидолитическая активность

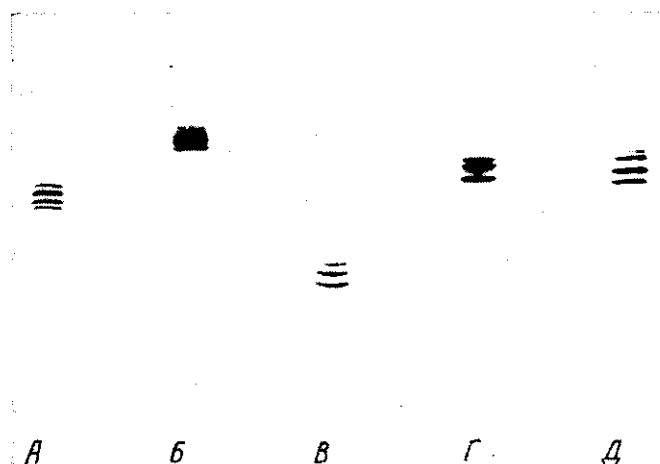


Рис. 2. Изоэлектрофокусирование моноклональных антител к урокиназе: а — UIG-1; б — UIG-2; в — UIG-3; г — UNG-4; д — UNG-5

Fig. 2. Isoelectrofocusing of monoclonal antibodies against urokinase: a — UIG-1; б — UIG-2; в — UIG-3; г — UNG-4; д — UNG-5

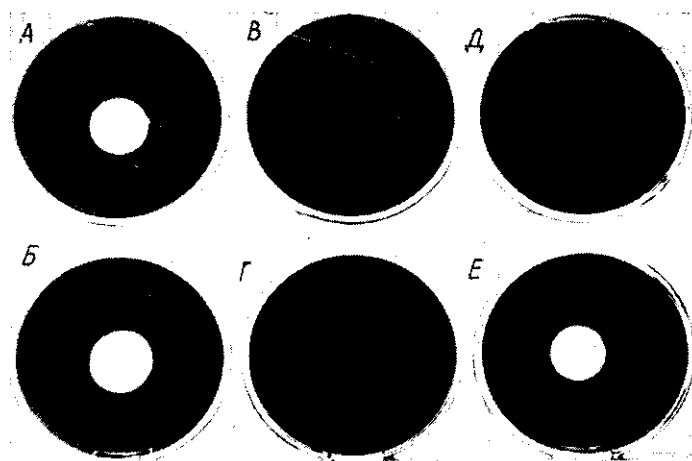


Рис. 3. Ингибирование урокиназы моноклональными антителами (определение активности урокиназы — на пластинках фибринового геля): а — UNG-4; б — UNG-5; в — UIG-1; г — UIG-2; д — UIG-3; е — контроль в отсутствие антител. Антитела в концентрации 10 нмоль/л добавляли в гель до полимеризации. Концентрация урокиназы 10 нмоль/л

Fig. 3. Inhibition of urokinase activity by monoclonal antibodies studies on fibrin gel plates: а — UNG-4; б — UNG-5; в — UIG-1; г — UIG-2; д — UIG-3; е — control without antibodies. Antibodies content — 10 nmol/l. Urokinase concentration — 10 nmol/l

урокиназы с хромогенным субстратом Glu-Gly-Arg-pNa ингибируется только антителами UIG-3. Антитела UNG-4 и UNG-5 не ингибируют активности урокиназы (рис. 2). Аффинность полученных антител можно оценить по константам ингибирования. Из данных, приведенных на рис. 4, следует, что константа ингибирования для антител UIG-3 составляет 1 нмоль/л, для UIG-1 и UIG-2 — 10 пмоль/л. Величины констант говорят о высокой аффинности антител. Проверку специфичности полученных антител проводили с помощью тестов связывания и тормо-

жения иммуносорбции посторонними антигенами. Ниже приведены антигены, которые были исследованы как в тесте прямого связывания, так и торможения иммуносорбции и не проявляли сродства к моноклональным антителам к урокиназе:

1. Трипсин
2. Химотрипсин
3. Плазмин
4. Эластаза
5. Пепсин
6. Тромбин
7. Овальбумин
8. Фибриноген
9. Гемоглобин
10. Человеческий сывороточный альбумин
11. Тканевый активатор плазминогена

Все антитела сохраняют функциональную активность после иммобилизации ковалентной пришивкой на агарозный гель. Иммуносорбенты эффективно связывают урокиназу из мочи: 1 мл сорбента с 2 мг антител связывает до 90 % урокиназной активности из 5 л мочи (около 0,5 мг урокиназы). После элюции урокиназы препарат имеет удельную активность 140 000 ед. Плоуга на 1 мг белка и содержит смесь низко- и высокомолекулярной форм урокиназы (рис. 5). Выход фермента в конечном препарате по отношению к исходному количеству в моче составляет 50—60 %.

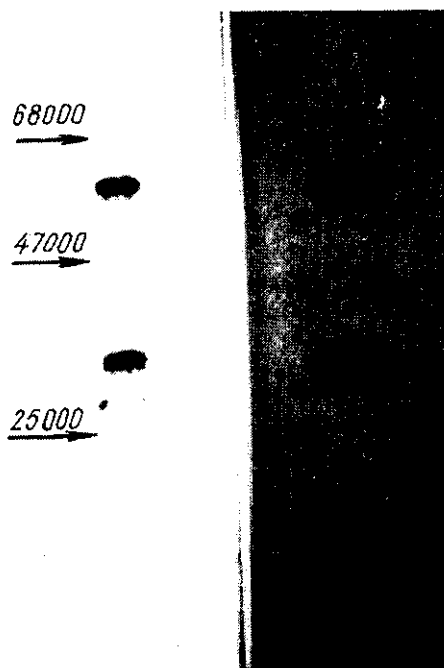
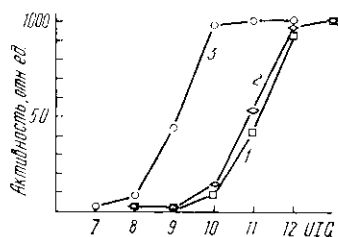


Рис. 4. Ингибирование урокиназы моноклональными антителами. Активность определяли с помощью хромогенного субстрата плазмينا. Концентрация урокиназы 10 пмоль/л, UIG — отрицательный десятичный логарифм молярной концентрации антител UIG-1 (1), UIG-2 (2), UIG-3 (3)

Fig. 4. Inhibition of urokinase activity by monoclonal antibodies studied with plasmin chromogenic substrate. Urokinase concentration — 10 pmol/l; UIG — negative lg of antibodies concentration UIG-1 (1); UIG-2 (2) and UIG-3 (3)

Рис. 5. Электрофорез и зимография препарата урокиназы, полученного из мочи одностадийной очисткой на сорбенте с моноклональными антителами

Fig. 5. Electrophoresis and zymography of urinary urokinase after one-step purification on sorbent with monoclonal antibodies

Задача получения моноклональных антител к урокиназе, способных в составе иммуносорбента эффективно связывать фермент непосредственно из человеческой мочи, с целью создания промышленной технологии является достаточно сложной. Это связано, в первую очередь, с тем, что антиген в моче присутствует в чрезвычайно низкой концентрации (1 нмоль/л). В то же время одним из требований технологии является высокая скорость протока жидкости через колонку с

иммуносорбентом. Таким образом, необходимо обеспечить хорошие кинетические параметры захвата фермента, что предъявляет высокие требования к аффинности антител. Для отбора клонов гибридных клеток, продуцирующих высокоаффинные и специфические антитела к урокиназе, в работе был предложен двухэтапный вариант скрининга кондиционированных культуральных сред. На втором этапе связывание урокиназы антителами тестируется по убыванию функциональной активности этого фермента, что позволяет применять для скрининга неочищенные препараты урокиназы или даже мочу. Низкая концентрация урокиназы в моче и присутствие разнообразных посторонних белков создают неблагоприятные условия для образования иммунного комплекса антитело — урокиназа. В связи с этим полноценное связывание урокиназы из мочи будет наблюдаться только для высокоаффинных и специфических антител. По этой причине применение «функционального» теста позволило из положительно ответивших при радиоиммунном анализе клонов отобрать лишь клоны — продуценты высокоаффинных антител, пригодных к созданию иммуносорбентов для выделения урокиназы из мочи. Это позволило существенно сократить объем работы по культивированию и клонированию гибридом — из 48 первичных популяций, ответивших положительно при радиоиммунном анализе, лишь девять успешно прошли испытания на «функциональном» тесте.

Следует особо отметить, что разработанный метод скрининга может оказаться полезным при получении моноклональных антител и к другим ферментам. Он позволяет работать, имея неочищенный препарат антигена. Известно, что многие ферменты в высокоочищенном виде либо дороги, либо вообще недоступны. Клоны — продуценты антител к примесным белкам — отсеиваются на втором этапе скрининга. Ранее предлагался вариант скрининга с использованием неочищенных препаратов ферментов по ингибированию их активности антителами [14], однако ограниченность данного метода очевидна — удается получать лишь ингибирующие моноклональные антитела. В нашем случае удалось, используя лишь частично очищенный препарат урокиназы, получить как ингибирующие (UIG-1, 2 и 3), так и неингибирующие (UNG-5, 6) моноклональные антитела. Высокие константы связывания ( $K_{инг}$  для UIG-1 и UIG-2 10 пмолей/л) позволили создать эффективные иммуносорбенты, пригодные для создания промышленной технологии одностадийного получения высокоочищенной урокиназы из человеческой мочи.

Полученные в работе моноклональные антитела различным образом модулируют активность урокиназы: UIG-1 и UIG-2 ингибируют активацию плазминогена, но не ингибируют амидолизиса низкомолекулярного субстрата, в то время как UIG-3 при связывании полностью инактивирует фермент; UNG-5 и UNG-6 не влияют на ферментативную активность. Очевидно, что набор антител с таким спектром свойств важен не только для биотехнологии, но и для исследования кинетических свойств и структуры урокиназы. Полученные антитела можно использовать и в клинической практике. Здесь следует отметить реальность создания на их основе диагностических тест-систем на фермент, а также возможное применение для направленного регулирования его активности при урокиназной терапии и при развитии патологических процессов, сопровождающихся повышением уровня урокиназы в тканях, как это известно в случае некоторых видов рака [15].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Collen D. On the regulation and control of fibrinolysis // *Thromb. Haemostas.*— 1981.—43, N 2.— P. 77—89.
2. Bertele V., Salzman E. W. Antithrombotic therapy in coronary artery disease // *Arteriosclerosis.*— 1985.—5, N 2.— P. 119—134.
3. Shibata T., Kakimoto T., Chibata I. Purification of high molecular weight urokinase from human urine and comparative study of two active forms of urokinase // *Thromb. Haemostas.*— 1983.—49, N 2.— P. 91—95.

4. Husain S., Gurewich V., Lipinski B. Purification and partial characterization of single-chain high molecular weight form of urokinase from human urine // Arch. Biochem. and Biophys.—1983.—220, N 1.— P. 31—38.
5. Huber K., Kirchheimer J., Binder B. Rapid isolation of HMW urokinase from native human urine // Thromb. Haemostas.—1982.—47, N 3.— P. 197—202.
6. Выделение и очистка урокиназы / С. В. Кольцова, Л. К. Шатаева, Т. Ф. Сухарева и др. // Вопр. мед. химии.—1981.—27, № 5.— С. 623—626.
7. Проявление аллельных генов легких цепей иммуноглобулинов в гибридных лимфоидных клетках / М. Н. Петросян, А. Б. Червонский, А. Р. Ибрагимов и др. // Докл. АН СССР.—1981.—256, № 2.— С. 509—512.
8. Density separation of spleen cells increases fusion frequency and yield of Ig-producing hybridomas / P. van Mourik, R. A. Rivero, Th. H. van der Kwast et al. // J. Immunol. Meth.—1984.—68, N 1.— P. 45—53.
9. Astrup T., Mullertz S. The fibrin plate method for estimation fibrinolytic activity // Arch. Biochem.—1951.—40.— P. 346—351.
10. Methods for determination of plasmin, antiplasmin and plasminogen by means of substrate S-2251 / P. Friberger, M. Knos, S. Gustavsson et al. // Haemostasis.—1978.—7, N 2—3.— P. 138—145.
11. Sumi H., Robbins K. S. A functionally active heavy from human high molecular weight urokinase // J. Biol. Chem.—1983.—258, N 13.— P. 8014—8019.
12. Laemmly U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227, N 5259.— P. 680—685.
13. Granelli-Piperno A., Reich E. A study of proteases and proteases inhibitor complexes in biological fluids // J. Exp. Med.—1978.—148, N 1.— P. 223—234.
14. Monoclonal antibody to human 66000 molecular weight plasminogen activator from melanoma cells. Specific enzyme inhibition and one-step affinity purification / L. S. Nielsen, J. G. Hansen, P. A. Andreasen et al. // EMBO J.—1983.—2.— P. 115—119.
15. Immunocytochemical localization of urokinase-type plasminogen activator in Lewis lung carcinoma / L. Skriver, L. Larsson, V. Kielberg et al. // J. Cell Biol.—1984.—99, N 2.— P. 753—758.

Ин-т эксперим. кардиологии

Всесоюз. кардиол. науч. центра АМН СССР, Москва

Ин-т высокомолекуляр. соединений АН СССР, Ленинград

НИИ гематологии и переливания крови МЗ РСФСР, Ленинград

Получено 02.11.87

#### MONOCLONAL ANTIBODIES FOR ONE-STEP ISOLATION OF HIGHLY PURIFIED UROKINASE

G. A. Kratasyuk, L. Z. Jakubov, V. V. Sinitsyn, D. S. Domogatsky, O. V. Rohklin

Institute of Experimental Cardiology, the All-Union Cardiological Research Center, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

N. A. Vunyaeva, Z. D. Fedorova

Institute of Haematology and Blood Transfusion, Ministry of Public Health of the RSFSR, Leningrad

S. V. Koltsova, G. V. Samsonov

Institute of High-Molecular Weight Compounds, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad

#### Summary

Five independent hybridoma clones producing monoclonal antibodies with high affinity and specificity for human urokinase are isolated using specially adopted screening technique. Both inhibiting urokinase activity and noninhibiting antibodies are obtained. They do not crossreact with other serin proteases and some of them have dissociation constants lower than 10 pmol/l. Immunosorbents with these monoclonal antibodies are effective for isolation of urokinase from urine: 2 mg of antibodies attached to 1 ml of sepharose binds 0.5 mg of urokinase.