

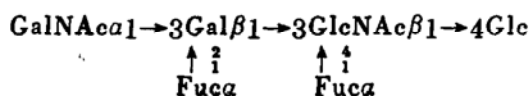
一株人抗人A—血型物质单克隆抗体特异性的研究

陈华堂¹ Larrick, J² Kabat, E. A³

(1. 安徽医科大学生化教研室, 合肥 230032)

(2. Cetus Immune Corporation, Palo Alto, CA94303; 3. Departments of Microbiology, Genetics and Development, and Neurology, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, N. Y. 10032, U. S. A.)

摘要 本文对一株人抗人A—血型物质单克隆抗体, 用定量免疫沉淀法以及ELISA研究其与多种单糖、双糖及寡糖的反应性, 从而确定了其结合部位的结构特异性。实验发现其结合部位互补于含有双分子岩藻糖残基的A-t糖:



这一研究进一步强调了含有双分子岩藻糖残基的A血型抗原决定基的重要性。

关键词: 单克隆抗体; 结合部位; 抗原决定基

在早期的研究中, 人们用纯化的A血型物质免疫B或者O血型的人, 得到高滴度的抗A血清^[1, 2]。根据已知结构的A活性寡糖抑制抗A血清和A血型物质的沉淀反应, 用量最小而给出最大抑制作用的寡糖结构即被认为互补于抗体结合部位的结构, 从而不太精确地测定出这些抗体结合部位的大小与特异性^[3]进而建立相应抗原决定基的结合。随后Voaka等^[5, 6, 7]制备了多种鼠抗人A血型物质的单克隆抗体。使用酶联免疫测定法(ELISA)或者放射免疫测定法(RIA)精确地测定出这些单克隆抗体结合部位的结构, 这些结构互补于含有单分子或者双分子岩藻糖残基的1型(Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc)或者2型(Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc)骨架的糖链结构^[8, 9]。

本文对一株人抗人A血型物质单克隆抗体用定量免疫沉淀反应观察其与各种血型物质的反应性及亲和力, 并用A—活性寡糖的抑制试验以探讨其结合部位的结构。

本课题得到国家教委《优秀年轻教师基金》资助

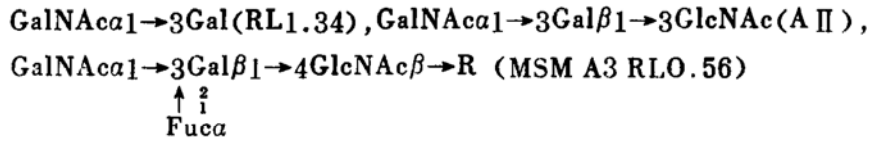
本文所采用的英文缩写: GalNAc, N-acetyl-D-galactosamine, Gal, D-galactose, Fuc, L-fucose, GlucNAc, N-acetyl-D-glucosamine, ELISA, enzyme-linked immunosorbent assays

收稿日期: 1989-09-25, 修回日期: 1990-06-22

材 料 与 方 法

一、材料

1. 人抗人 A 型物质单克隆抗体由 Dr. J. Larrick 提供。由体外受过人 A 红细胞免疫的 B 淋巴细胞通过 EB 病毒转化而成。用亲和层析法加以纯化。
2. 各种纯化的 A, B, H, Le^a, Le^b 和 Ii 血型物质从人的唾液或猪, 马, 牛胃粘膜分离提取。
3. 各种单糖与寡糖: 各种单糖购自 Sigma 公司,



由水解 A 血型物质制得^[11]。01, 04 和 13 由 Dr. Don Baker 提供。A-tetra., A-penta., A-hexa., A-hepta., B-tri. 和 B-penta. 由 Dr. A. Lundblad 赠送。

4. ELISA 试剂: 碱性磷酸酶, 对硝基酚磷酸购自 Sigma. 亲和层析纯化的羊抗人 IgM 购自 Kirke-gaard and Perry 试验室。碱性磷酸酶和羊抗人 IgM 抗体偶联物的制备按戊二醛一步法进行^[12]。

二、实验方法

1. 定量免疫沉淀法: 应用微量沉淀技术^[13], 每次测定取约 5—8 μg 抗体氮, 反应体积用生理盐水补充至 200 μL 。沉淀物的含氮量用茚三酮法测定^[14]。
2. 血凝试验用 Takatsy 微量滴定法进行, 每孔加 A, B 或者 O 红细胞 2% 悬浮液 25 μL , 室温下放置一小时后记录血凝结果。
3. 免疫扩散试验采用 Ouchterlony 法^[14]。
4. ELISA 定量抑制试验法如前述^[8], 但是用 100 μl 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 A 血型物质 Hog 410% 包被测定板 (Corning)。

结 果

血凝试验表明此单克隆抗体对 A 型血细胞有绝对特异的凝集活性, 即使用 1 mg/mL 蛋白浓度的抗体也不凝集 B 和 O 型红细胞。其凝集 A₁ 型血细胞的滴度达 1280, 而凝集 A₂ 型红细胞的滴度则低一倍。这与以往的试验结果一致^[10]。

Fig. 1 给出各种血型物质沉淀人抗人 A 血型物质单克隆抗体所得到的沉淀曲线。被各种 A, B, H, L^a, L^b 和前体 Ii 血型物质沉淀的总氮量总结于 Table 1。该抗体与 A 血型物质 Hog 410% 反应最强烈, Hog 410% 沉淀最大抗体氮 6.5 μg 。A₁ 血型物质, Cyst 9. phenol-insoluble 及 A₂ 血型物质, Cyst 14 phenol-insoluble 也可强烈沉淀抗 A 单克隆抗体, 分别沉淀最大抗体氮

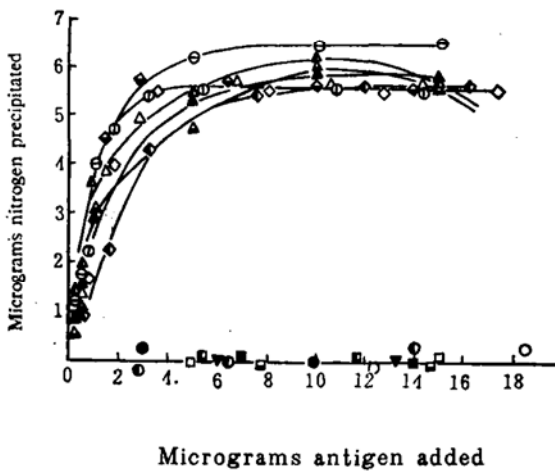


Fig. 1 Quantitative precipitin curves of human monoclonal anti-A by various blood group substances. Symbols used in the Figure as shown in Table 1.

而对 Cyst Beach phenol-insoluble (B), Tij 11 phenol-insoluble (BI), N-1 phenol-insoluble (L_e^a), JS phenol-insoluble (L_e^b), Tighe phenol-insoluble (H) 和 Cyst OG 10% from 20% (Ii) 均无反应性, 进一步证实人单克隆抗 A 抗体对 A 血型的高度特异性。

Table 1 Blood group substances used in quantitative precipitation of human monoclonal anti-A as shown in Fig. 1

Symbol	Blood Group Substance	Maximum N precipitated (μg)	Blood group substance required for 50% of maximum N PPT (μg)
⊖	Hog 4 10% (A)	6.5	0.8
△	Cyst 9 phenol-insoluble (A_1)	6.2	0.7
▲	Cyst 14 phenol-insoluble (A_2)	6.0	1.0
▲	MSM 10 (A_1)	5.8	1.1
◆	Hog 75 10% (A)	5.8	0.7
△	MSS 10% 2x (A_1)	5.7	0.7
◇	McDon. 15% (A_1)	5.6	1.0
⊙	Hog 67 4% (A)	5.6	1.0
◆	W. G. phenol-insoluble (A_2)	5.6	1.9
●	Cyst Beach phenol-insoluble (B)	0	
■	N-1 phenol-insoluble (L_e^a)	0	
■	JS phenol-insoluble (HLe^b)	0	
○	Tij I phenol-insoluble (BI)	0	
■	Tighe phenol-insoluble (H)	0	
▼	Cyst OG 10% from 20% (Ii)	0	

6.2 μg 和 6.0 μg , 并且当抗原过剩时都出现沉淀抑制现象。MSM 10% (A_1) 和 Hog 75 10% (A) 沉淀 5.8 μg 最大抗体氮。MSS 10% 2x (A_1) 沉淀 5.7 μg 最大抗体氮。McDon 15% (A_1), W. G. phenol-insoluble (A_2) 和 Hog 67 4% 表现出较弱的反应性, 都仅沉淀 5.6 μg 最大抗体氮。

为了沉淀 50% 最大抗体氮, 各种 A 活性血型物质的需要量十分接近。除 A_2 血型物质 W. G. phenol-insoluble 需 1.9 μg 外, 其余均在 0.9—1.1 μg 范围内 (Table 1)。

用 ELISA 测定出各种单糖或寡糖对人单克隆抗 A 抗体与 A 血型物质 Hog4 10% 结合的抑制能力, Fig.2 给出抑制曲线。Table 2 给出各种寡糖的分子结构以及 50% 抑制作用时的需要量。含有双分子岩藻糖残基的 A 血型活性寡糖, A-hepta., 为最强抑制剂, 仅需 2.2 n mole 即可产生 50% 抑制作用。接着为另一种含双分子岩藻糖残基的 A-penta., 3.3 nmol 给出 50% 抑制作用, 用量为 A-hepta. 的 1.5 倍。

含单分子残基的 A 血型活性寡糖表现出较低的抑制活性。按照抑制能力, 它们依次为: A-hexa., 25 n mole 给出 50% 抑制作用, 抑制活性较 A-hepta. 低 10 倍; A-Tetra. 和 MSM A₃R_L0.53 表现出相同的抑制活性, 35 n mole 给出 50% 抑制作用, 较 A-hepta. 低 15 倍; A-tri. 和 01 表现出相同的抑制活性, 给出 50% 抑制作用需要 50 n mole, 较 A-hepta. 弱 22 倍。

与含有单或双分子岩藻糖的寡糖比较, 缺乏岩藻糖的寡糖表现出非常低活性。如 A₅11 需要 63 nmole 给出 50% 抑制作用, 比 A-hepta. 低 28 倍; R_L1.34 给出 50% 抑制作用需要 74 nmole, 为最强抑制剂 A-hepta. 的 33 倍。

所有试验过的单糖, D-GalNAc, D-Gal 和 L-Fuc 即使在 500 nmole 时也未表现出抑制活性。

B 血型活性寡糖: B-tri. 和 B-penta., 以及 H- 活性寡糖 04 在试验剂量范围内均无抑制活性。

讨 论

这是 Larrick 氏制备的世界上第一珠人抗人 A 血型物质的单克隆抗体。我们用免疫化学方法对其进行了详细研究, 结果表明此单克隆抗体对 A 血型物质有特异性。各种 A、A₁ 和 A₂ 血型物质能强烈沉淀比单克隆抗体, Hog4 10% 是最强者, 依次是 Cyst 9 phenol-insoluble 和 Cyst 14 phenol-insoluble, 并且二者都出现抗原过量抑制现象。其余的 A 和 A₁ 血型物质沉淀的最大抗体氮量非常接近。一般情况下, 沉淀 50% 最大抗体氮所需要的血型物质质量反映了抗体对此血型物质的亲和力, 值得注意的现象是人唾液血型物质 W. G. phenol-insoluble 表现出较低的亲和力, 其沉淀 50% 最大抗体氮的需要量为其它血型 A 血型物质的二倍。早期的研究暗示在唾液血型物质中最主要的抗原决定基为含有双分子岩藻糖残基的糖链^[15]。定量抑制试验表明, 此单克隆抗体对含有双分子岩藻糖残基的寡糖具有较高的亲和力。一个可能的解释是在 W. G. phenol-insoluble 分子上存在着较少的抗原决定基。B, H, L_a, L_b 和 Ii 血型物质不与单克隆抗 A 发生任何沉淀反应。

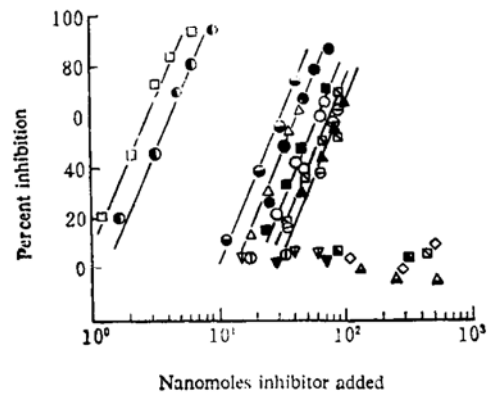
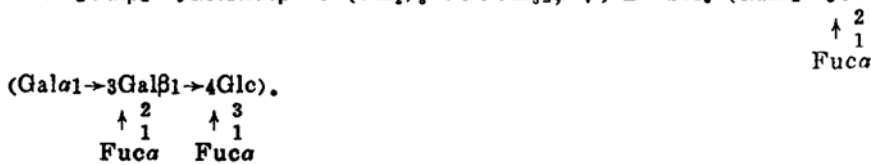


Fig.2 Inhibition by various oligosaccharides of binding of human monoclonal anti-A by A blood group substance Hog4 10%. Symbols used in the Figure as shown in Table 2.

Table 2 Oligosaccharides active in inhibition assays by ELISA (seeA Figure 2)

Sensibl	Oligosaccharide	Structure	50 Percent inhibition (nanomoles)	$\Delta\Delta G^*$ Kcal/mol
▲	RL1.34	GalNAca1→3Gal	74	+ 0.21
⊖	13	GalNAca1→3Galβ-O(CH ₂) ₆ -COOCH ₃	74	+ 0.21
⊠	A ₅ II	GalNAca1→3Galβ1 >361cNAC	63	+ 0.21
■	A-Tri	GalNAca1→3Gal ↑ ² Fuca	50	0
○	01	GalNAca1→3Galβ-O(CH ₂) ₆ -COOCH ₃ ↑ ² Fuca	50	0
●	A-Tetra	GalNAca1→3Galβ1→461c ↑ ² Fuca	35	- 0.19
△	MSMA,RL0.56	GalNAca1→3Galβ1→461cNAcβ-R ↑ ² Fuca	35	- 0.19
⊙	A-Penta	GalNAca1→3Galβ1→461c ↑ ² ↑ ³ Fuca Fuca	3.3	- 1.47
⊙	A-Hexa	GalNAca1→3Galβ→361cNAcβ1→36alβ1→461c ↑ ² Fuca	25	- 0.37
□	A-Hepta	GalNAca1→3Galβ1→361cNAcβ1→36alβ1→461c ↑ ² ↑ ⁴ Fuca Fuca	2.2	- 1.69

The following mono- and oligosaccharides at the amounts tested gave no significant inhibition with the monoclonal human anti-A₁: ⊠, D-GalNAc, ▲, L-Fuc, ◇, D-Gal, ▽, 04 [Fucal→2Galβ1→3GlcNAcβ-O(CH₂)₆-COOCH₃], ▼, B-Tri. (Galα1←3Gal), ⊕, B-Penta.



* The $\Delta\Delta G^*$ of A-Tri was assigned as a $\Delta\Delta G^*$ of 0.

人单克隆抗 A 抗体结合部位结构及其特异性的最重要知识来自定量 ELISA 抑制试验 (Fig.2 and Table 2)。按照各种 A-活性寡糖抑制活性高低次序, 人单克隆抗 A 抗体的抑制顺序为: A-hepta. > A-penta. > A-hexa. > A-tetra. = MSM A₃R_L0.56 > A-tri. = 01 > A₅I > R_L1.34 = 13, 这非常类似于从鼠抗人 A 血型物质单克隆抗体 AC-1001, MH₂/6D4 以及 A003 = 40/5G7 所得到的结果^[8], 但 A₅II, R_L1.34 在鼠抗人单抗试验中表现无抑制活性, 13 未作试验。对于人单克隆抗 A, 含有双分子岩藻糖残基的寡糖的相对抑制活性远远高于含单分子岩藻糖或不含岩藻糖的寡糖。而三珠鼠抗人单克隆抗 A, 含双分子岩藻糖残基的 A-penta. 与含单分子岩藻糖残基的 A-hexa. 表现出几乎相同的抑制活性。这意味着人单克隆抗 A 对含

双分子岩藻糖的寡糖有较高亲和力。

为精确地估计各种寡糖抑制剂的结构与抑制活性的相关性,用标准公式: $\Delta\Delta G^\circ = 273R \ln(x/y)$ [8, 16, 17], 计算各抑制剂与抗 A 结合的自由能 ($\Delta\Delta G^\circ$) 大小, 此处 X 表示在 0°C 给出 50% 抑制作用所用抑制剂的量 (n mole), Y 表示 A-tri. 在给出 50% 抑制作用时的用量 (nmole), 若假定 A-tri. 的 $\Delta\Delta G^\circ$ 值为 0, 比较所有抑制剂在 A-tri. 结构基础上所进行的结构修饰而导致的结合自由能的改变。若 A-tri. 通过 $\beta 1 \rightarrow 3$ 连结键连接到 Glc., 或者连接到 $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$, 从而形成 A-tetra. 或 A-hexa., 则 $\Delta\Delta G^\circ$ 分别增加 -0.19kcal/mol 和 -0.39kcal/mol , 这暗示在抗体结合部位, A-tetra. 和 A-hexa. 较 A-tri. 有较紧密的结合。当第二个岩藻糖分子以 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 连结键连接到 A-tetra. 的乙型键上, 或者以 $\alpha 1 \rightarrow 4$ 连接到 A-hexa. 的 1 型键上从而形成 A-penta. 或 A-hepta. 时, $\Delta\Delta G^\circ$ 值分别增加 -1.28kcal/mol , 或 -1.32kcal/mole , 非常接近。这表明第二个岩藻糖分子的导入显著地增加了抑制剂与抗体结合时的亲和力, 同时也表明此单克隆抗 A 抗体不能够区别 1 型和 2 型链的结构。比较 $R_L 1.34$ 和 13, A-tri. 和 01 以及 A-tetra. 和 $\text{MSMA}_3R_L 0.56$ 的 $\Delta\Delta G^\circ$ 无区别, 清楚地表明 13 和 01 中的 $-\text{O}(\text{CH}_2)_8\text{COOMe}$ 以及 $\text{MSM A}_3R_L 0.56$ 中的 hexenetetrol(R) 对结合的自由能无影响。

参 考 文 献

- [1] Witebsky E, et al. *Proc Soc Expt Biol Med*, 1944, 55: 167—170
- [2] Kabat E A, Bezer A E. *J Exp Med*. 1945, 82: 207—215
- [3] Lloyd K O, Kabat E A, *Proc Natl Acad Sci (U.S.A.)*, 1968, 61: 1470—1477
- [4] Kohler G, Milstein C. *Nature*, 1975, 256: 495—497
- [5] Voak D, et al. *Vox Sang*, 1980, 39: 134—140
- [6] Messeter L, et al. *Vox Sang*, 1984, 46: 185—194
- [7] Abe K, et al. *J Immunol*, 1984, 132: 1951—1954
- [8] Chen H—T, Kabat E A. *J Biol Chem*, 1985, 260: 13208—13217
- [9] Gooi H C, et al. *J Biol Chem*, 1985, 260: 13218—13224
- [10] Raubitschek A, et al. *Vox Sang*, 1985, 48: 305—308
- [11] Lloyd K O, et al. *Biochemistry*, 1966, 5: 1489—1501
- [12] Avrameans S, et al. *J Immunol*, 1978, 8: suppl. 7: 7—23
- [13] Kabat E A. *Methods Enzymol*, 1980, 70: 3—39
- [14] Ouchterlony O. *Acta Path Microbiol Scand*, 1948, 25: 186—191
- [15] Sakamoto J, et al. *Molec Immunol*, 1984, 21: 1093—1098
- [16] Lemieux R U, et al. *Molec Immunol*, 1984, 21: 751—759
- [17] Kabat E A. *J Immunol*, 1956, 77: 377—385
- [18] Chen H—T, et al. *J Biol Chem*, 1987, 262: 13579—13583

Studies on the specificity of a Human Monoclonal Antibody Against A Blood Group Substance

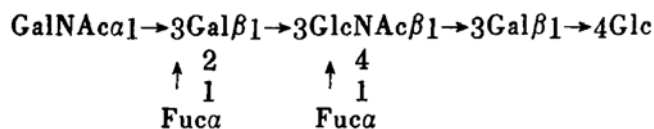
Chen, Hua-Tang¹, J. Larrick², E. A. Kabat³,

(1. Department of Biochemistry, Anhui Medical University, Hefei, 230032

2. Cetus Immune Corporation, Palo Alto, CA 94303;

3. Departments of Microbiology, Genetics and Development, and Neurology, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, New York 10032, U.S.A.)

Abstract This is the first human monoclonal antibody against A blood group substance, generated by Epstein-Barr virus transformation of human lymphocyte isolated from splenic tissue after activation in vitro with group A blood cells. The antibody has been characterized by quantitative precipitin assays and the fine structure of its combining site has been mapped by quantitative ELISA assays by using A-active oligosaccharides to inhibit the binding of anti-A and A blood group substance. The human monoclonal anti-A strongly precipitated various A-active blood group substances, but not B, H, Le^a, and the precursor of Ii substances. The combining site was most complementary to the difucose containing A-Hep tetrasaccharide:



These studies further emphasize the importance of difucosyl determinants.

Key words: Monoclonal antibody; Combining site; Antigenic determinant