

UDK 619:616.988:616-097

Valčić M. A., Sonja Radojičić, Sonja Obrenović, Bacić D. \*

## MONOKLONSKA ANTITELA U SLUŽBI KARAKTERIZACIJE I MODIFIKACIJE VIRUSNIH ANTIGENA<sup>1</sup>

### Kratak sadržaj

Od brojnih polja primene (dijagnostika, ispitivanje patogeneze infekcija, terapija tumora), u proteklih nekoliko decenija monoklonska antitela (MAT) su se intenzivno koristila i u karakterisanju virusnih antigena. U zavisnosti od procedure obavljanja pojedinih seroloških reakcija, tačnije – u zavisnosti od načina pripreme antigena, moguće je zaključiti da li se kao antigen koristi cela virusna čestica ili se radi o nekoj njenoj supstrukturi. Koristeći Western blot, radio imuno test i precipitaciju u gelu, kao i neutralizacione testove *in vivo* (neutralizacija u miševima) i *in vitro* (plak redukcioni test), ustanovljeno je da se u sturkturi virusa uzročnika slinavke i šapa nalaze sekvencionalni (najviše 7) i konformacioni (najviše 12) epitopi. Prilikom obavljanja preliminarnih ispitivanja kompetitivnog radio imuno testa, ustanovljeno je da jedno monoklonsko antitelo, kada formira imuni kompleks sa epitopom za koji je specifično, uslovi pojačavanje vezivanja najmanje tri monoklonska antitela koja su specifična za epitope od kojih je jedan bio sekvencionalan, a dva su bila zavisna od konformacije antigene strukture.

*Ključne reči: monoklonska antitela, virus.*

Miroslav A. Valčić, Sonja Radojičić, Sonja Obrenović, Dragan Bacić\*

## MONOCLONAL ANTIBODIES AS A TOOL FOR VIRUS ANTIGEN CHARACTERIZATION AND MODIFICATION

### Abstract

Of the many fields of application (diagnosis, testing the pathogenesis of infections, cancer therapy) over the past few decades, monoclonal antibody (mAb) have been extensively used in the characterization of viral antigens. Depending on the procedures for carrying out some serological reactions, and depending on the method of preparing antigen in particular, it is possible to investigate whether the antigen used is a whole virus or was it an its substructure. Using Western blot, radio-immunoassay and gel precipitation and neutralization tests *in vivo* (neutralization in mice) and *in vitro* (plaque reduction test), it was found that the in the structure of the virus that causes foot and mouth disease, there are sequential (maximum 7) and conformation (maximum 12) epitopes. During the preliminary investigations in order to prepare competitive radio immunoassay test, it was found that one monoclonal antibody, when in immune complex with the epitope for which it is specific, increased binding at least three monoclonal antibodies specific for epitopes of which one was sekvencionalan and two have been dependent on the conformation of the antigen structure.

*Key words: monoclonal antibodies, virus.*

---

\* Dr Miroslav A. Valčić, redovni profesor, dr Sonja Radojičić, vanredni profesor, dr Sonja Obrenović i dr Dragan Bacić, asistenti, Katedra za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Bulevar oslobođenja 18, 11000, Beograd, mvalcic@mail.com

<sup>1</sup> Rad je finansiran sredstvima projekta TR 31088, Ministarstva za nauku i tehnologiju Republike Srbije.

\* Miroslav A. Valčić, PhD, full time professor, Sonja Radojičić, PhD, Part time professor, Sonja Obrenović and Dragan Bacić, professor's assistance, Faculty of veterinary medicine, University of Belgrade, mvalcic@mail.com

## UVOD

Virus slinavke i šapa, afto virus pikornavirusne familije, u svojoj strukturi poseduje 60 kopija četiri kapsidna virusna proteina: VP1, VP2, VP3 i VP4. Ovaj proteinski kapsid okružuje jednostruki molekul RNK pozitivnog polariteta. Heterogenost antigene strukture virusa se ogleda u postojanju sedam serotipova, od kojih su tri takozvani evropski serotipovi (O, A i C), tri su svrstani u južnoafričke serotipove (SAT1, SAT2 i SAT3), a jedan je svrstan u posebnu Azija-1 grupu. Varijabilnost antigene strukture ovog virusa ogleda se i u postojanju brojnih (preko 60) suptipova (Grubman and Baxt, 2004), istovremeno predstavljajući značajan problem u definisanju i sprovođenju efikasnih programa vakcinacije.

Prijemčivi su papkari, a oboljenje je najčešće (sa izuzetkom sasvim mladih životinja) benignog karaktera. Produktivnost, a naročito proizvodnja mleka obolelih i životinja u konvalescentnom stanju je značajno smanjena. Poznato je da je cena mleka u razvijenim zemljama činilac koji značajno utiče na paritet cena u poljoprivrednoj proizvodnji. Istovremeno, proizvodnja mleka, pored brojerske proizvodnje u živinarstvu i multi-sajt tehnologiji proizvodnje u svinjarstvu, smatra se jednom od najintenzivnijih u stočarstvu. Pored navedenih činilaca, region i zemlja u kojoj se slinavka i šap javljaju enzootijski ili kada se oboljenje javi u epizootijskom obliku, trpe značajne restrikcije u izvozu i prometu poljoprivrednih proizvoda.

Epizootiološke karakteristike slinavke i šapa kao najkontagioznijeg infektivnog oboljenja uopšte, značajno utiču na opšteprihvaćeni stav da je spremnost veterinarske službe date države da kontroliše, suzbija i iskorenjuje ovo oboljenje pokazatelj sposobnosti te službe. U regionima sveta gde se slinavka i šap javljaju enzootijski, oboljenje se kontroliše vakcinacijom u pravilnim vremenskim razmacima (Brown, F., 1985). Sa druge strane, u razvijenim zemljama i u zemljama u razvoju sa veterinarskom službom na visokom nivou, slinavka i šap se suzbija i iskorenjuje striktnim stamping out merama.

Vakcinacija je mera koja je prihvatljiva u slučaju kontrole velikog broja infektivnih oboljenja ekonomski značajnih vrsta životinja. Međutim, u slučaju slinavke i šapa postoje brojni problemi, od kojih su neki: proizvodnja vakcine mora da se obavlja u strogo izolovanim objektima i pod striktnim nadzorom, inaktivacija virusa mora da bude rigorozno praćena,

neophodno je postojanje sistema „hladnog lanca“ prilikom distribucije i upotrebe vakcine na terenu itd.

Međutim, u slučaju vakcina protiv slinavke i šapa, od ključnog značaja je poznavanje diskretnih antigenih promena i često prisustva odnosno odsustva pojedinih epitopa kao jedinica antigene strukture.

Od vremena kada su nam Köhler i Millstein (1975) podarili metodu karakterizacije antigena monoklonskim antitelima (MAT), ovi molekuli imunoglobulina se često koriste (Bolwel et al., 1989; Valčić i Panjević, 1991) u cilju davanja odgovora na pitanje koji segmenti antigene strukture, na primer virusa, imaju neku fiziološku i biološku funkciju. Naravno, pre svega, radi se o imunogenim karakteristikama uzročnika infektivnih oboljenja životinja i ljudi.

Grubman i Morgan su 1986/87. pokazali da se u okviru virusa SiŠ-a nalaze epitopi čije su struktura i sposobnost vezivanja za specifično antitelo zavisne isključivo od poretka aminokiselina. Za takve epitope se kaže da su sekvencionalni. Međutim, poznato je da proteinski lanci najčešće u prostoru grade kompleksne trodimenzionalne strukture uslovljavajući da na taj način aktivna mesta (u ovom slučaju epitopi) zavise i od konformacije proteina. Takve epitope, koji se sastoje od prostorno bliskih, a u poretku udaljenih aminokiselina, nazivamo konformacionim (Barnett, P. V. et al., 1998).

Često se konformaciona struktura proteina gubi tokom, na primer, denaturacije proteina. Istovremeno, kada govorimo o antigenim karakteristikama, konformacioni epitopi predstavljaju i najznačajnija mesta vezivanja specifičnih antitela, pa samim tim igraju važnu ulogu u neutralizaciji mikroorganizama.

Koristeći metode analize prisustva sekvencionalnih i konformacionih epitopa, obavili smo ispitivanje virusa uzročnika slinavke i šapa. Istovremeno, koristeći monklonska antitela, obavili smo ispitivanja mogućih uticaja pojedinih MAT na neke fiziološke funkcije virusa. Naime, tokom obavljanja kompetitivnog radioimuno testa, ustanovljeno je da se neka MAT snažnije vežu u slučaju da je drugi epitop virusa formirao imuni kompleks sa „svojim“ MAT. Otuda se u radu prikazuje i analizira i fenomen koji u svojoj osnovi može da ima tri mehanizma: 1. stabilizacija imunog kompleksa, 2. povećanje aviditeta i 3. povećanje afiniteta.

**MATERIJAL I METODE RADA**

*Virus*, uzročnik slinavke i šapa C3Resende je izolovan iz materijala, umnožen u kulturi ćelija bubrega hrčka (BHK-21) i delimično prečišćen precipitacijom sa polietilen glikolom (Wagner et al., 1970).

*Monoklonska antitela* su proizvedena po već opisanoj metodi (Letchworth and Appleton, 1984). Odabrani klonovi hibridnih ćelija su umnoženi, a supernatant je upotrebljavan za koncentraciju imunoglobulina afinitetnom hromatografijom (protein A ili anti IgM). Prečišćavanje i koncentracija imunoglobulina obavljena je po metodi koja je već opisana (Harlow and Lane, 1988). Prečišćena MAT su obeležavana radioaktivnim jodom po već opisanoj „jodogen“ proceduri (Stave et al., 1986).

*Agar gel imunodifuzioni test* (Ouchterlony) obavljen je po već opisanoj metodi (Stave et al., 1986).

*Imuno (Western) blot* metoda je rađena prema originalnoj tehnici (Laemmli, 1970).

Radioimuno test (RIA) i kompetitivni radioimuno test C-RIA rađeni su prema metodi koju je opisao Gerhard i Bachi (1986). Ukratko, mikrotitar ploče su prethodno obložene specifičnim anti-SiŠ C3

serumom poreklom od zamoraca. Optimalna količina virusa koja je upotrebljena za nanošenje po jednom bazenčiću mikrotitar ploče bila je 500 nanograma/50µl/bazenčić. Ovakve ploče su upotrebljavane za test vezivanja radioaktivno obeleženih MAT za virus. U svaki bazenčić sa fiksiranim virusom, uliveno je po 50 µl supernatanta hibridoma. Prilikom izvođenja C-RIA, odabrana MAT su obeležavana i upotrebljavana u heterologom testu: obeleženo „a“ MAT i neobeleženo „b“ MAT. Stepem inhibicije vezivanja radioaktivno obeleženog MAT bio je pokazatelj da se radi o antitelu koje je slično ili različito u odnosu na specifičnost prema epitopu. Upotrebljeno je 13 radioaktivno obeleženih MAT i 14 MAT kao kompetitori.

**REZULTATI**

Tabela 1. prikazuje listu ispitivanih MAT u odnosu na rezultate imuno (Western) blota, radioimuno testa i agar gel imunodifuzionog testa (Ouchterlony). Od odabranih 13 MAT, pet je reagovalo u Western blot testu.

Pet MAT je reagovalo sa virusnim antigenima u radioimuno testu, a u testu precipitacije u gelu, sedam MAT je dalo pozitivnu reakciju.

MAT	Western blot	RIA	Ouchterlony
AC-3	-	-	-
AG-1	-	-	-
BC-12	-	-	+
BB-12	-	-	+
BD-3	+	-	-
CB-5	+	-	+
CB-6	+	+	+
HB-3	-	-	-
DE-9	-	-	-
AF-11	+	+	-
AE-12	-	+	+
IB-4	-	+	+
AH-2	+	+	+

**Tabela 1.** Rezultati seroloških testova pojedinih monoklonskih antitela

Prilikom selekcije hibridnih ćelija, jedan od osnovnih kriterijuma je sposobnost supernatanta da obavi neutralizaciju virusa. Obavljena su dva neutralizaciona testa, a rezultati su prikazani kao negativni

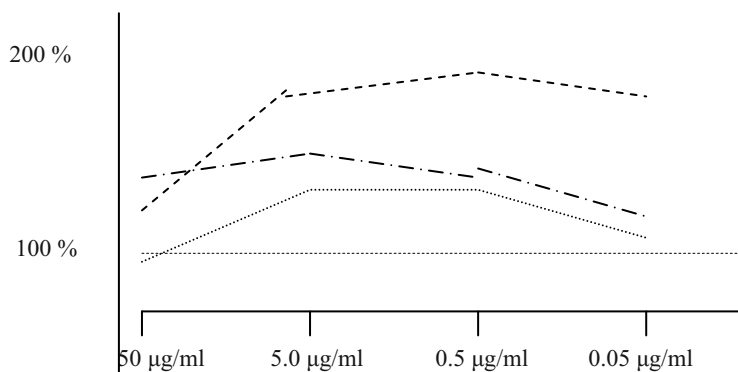
logaritmi (log<sub>10</sub>) razređenja koja su uzrokovala inhibiciju dejstva virusa i to u *in vivo* (miš) testu 50%, a u *in vitro* testu 70% (tabela 2).

MAT	Neutralizacija	
	<i>In vivo</i> (miš)	<i>In vitro</i>
AC-3	3.09	4.00
AG-1	2.19	1.34
BC-12	2.65	3.11
BB-12	2.15	2.65
BD-3	1.68	2.90
CB-5	1.30	1.00
CB-6	2.30	1.65
HB-3	1.06	1.00
DE-9	0.75	0.50
AF-11	1.62	2.53
AE-12	1.42	0.35
IB-4	1.92	2.33
AH-2	< 0.30	< 0.3

**Tabela 2.** Rezultati testova (*in vivo* i *in vitro*) neutralizacije

Rezultati vezivanja tri MAT u kompetitivnom radioimuno testu prikazani su grafički (grafikon 1). Osnovna linija (100% vezivanja) predstavlja broj impulsa za svako obeleženo MAT. Monoklonsko antitelo AG-1 se dvostruko snažnije vezivalo za

epitop na virusu u slučaju kada je MAT AH-2 bilo vezano za „svoj“ epitop. Povećanje intenziteta vezivanja druga dva MAT (HB-3 i AF-11) bilo je manje i iznosilo je 55%, odnosno 33%.



**Grafikon 1.** Stepen povećanja intenziteta vezivanja tri MAT u slučaju da je MAT AH-2 formiralo imuni kompleks na virusu. ( — ): AG-1, HB-3 ( ..... ) i AF-11 ( — ).

## DISKUSIJA

Upotrebljeno je 13 monoklonskih antitela u cilju karakterizacije antigenih epitopa na površini virusa uzročnika slinavke i šapa, a prema njihovoj sposob-

nosti za vezivanje za konformacione, odnosno sekvencione jedinice antigene strukture.

Serološkim ispitivanjima različitim metodama prikazano je da je u testu koji podrazumeva pripremu antigena na način da se gube konformacioni

epitopi (Western blot), bilo pozitivno pet MAT, i to: BD-3, CB-5, CB-6, AF-11 i AH-2. Radi se o metodi koja podrazumeva prethodno elektroforetsko razdvajanje virusnih proteina. Na taj način, dobijaju se izolovani proteini. Međutim, prilikom pripreme virusa za elektroforezu, istovremeno dolazi do „ispravljanja“ proteinskih lanaca. Na taj način gube se konformacioni epitopi. Istovremeno, na ovaj način pripremljeni virusni proteini zadržavaju samo one antigene karakteristike koje su uslovljene primarnim poretkom aminokiselina u lancu. Sva MAT koja su reagovala u tom testu su, dakle, specifična za one epitope čija je specifičnost zavisna samo od poretka aminokiselina u proteinskom lancu.

Sva MAT koja su reagovala u Western blot testu bila su specifična za virusni protein – 1. Poznato je da je VP-1 imunodominantan (Strohmaier et al., 1982) i da se većina neutralizacionih epitopa nalazi u okviru ove strukture virusa slinavke i šapa.

Priprema virusnog antigena za druga dva serološka testa podrazumevala je prečišćavanje supernatanta kulture ćelija, i to delimično, precipitacijom i u gradijentu gustine CsCl. Na ovaj način, pripremljeni virusni antigen je bio, u suštini, suspenzija celih virusnih čestica (140S).

U radioimuno testu, bilo je pozitivno pet MAT: CB-6, AF-11, AE-12, IB-4 i AH-2. U agar gel imunodifuzionom testu bilo je pozitivno sedam MAT: BC-12, BB-12, CB-5, CB-6, AE-12, IB-4 i AH-2.

Svih 13 MAT je posedovalo neutralizacionu sposobnost, bilo u testu neutralizacije virusa u miševima (*in vivo*), bilo da se radilo o plak redukcijom testu kao metodi ispitivanja sposobnosti neutralizacije virusa u kulturi ćelija (*in vitro*). Kod većine MAT, sposobnost neutralizacije virusa, izražena koncentracijom imunoglobulina u suspenziji (titrom), bila je slična za oba testa. Međutim, kod jednog MAT (AE-12), u *in vivo* testu sposobnost neutralizacije je bila značajna (1.42), a u *in vitro* testu, titar je bio 0.35, što je neznatno veći titar od onoga koji je određen kao granični. U drugom pak slučaju, MAT AH-2, iako nije uslovljavalo neutralizaciju u oba testa (*in vitro* i *in vivo*), reagovalo je u sva tri serološka testa.

Gubljenje fizioloških funkcija (antigenih karakteristika) konformacionih epitopa prilikom razbijanja sekundarnih i tercijarnih struktura proteinskih lanaca predstavlja osnovu razlika u imunogenosti de-

naturisanih antigena sa jedne strane i nativnih proteina, sa druge. Naime, poznato je da se inaktivisane vakcine proizvode tako da je antigen obrađen na način da se značajan deo proteina denaturiše (Dunn et al., 1998). Na taj način se gubi veći deo konformacionih epitopa, pa je to jedan od razloga za slabije imunogene karakteristike ovakvih vakcina. Žive pak vakcine poseduju uzročnike infektivnih oboljenja koji su oslabljeni, ali ipak zadržavaju konformacione epitope.

Veći broj MAT koja izazivaju neutralizaciju cele virusne čestice u ovoj studiji prikazuje da se u strukturi virusa uzročnika slinavke i šapa verovatno nalazi veći broj konformacionih epitopa u poređenju sa onim čija specifičnost zavisi samo od primarnog poretka aminokiselina. Na pitanje da li su svih 13 MAT specifični za različite epitope, potrebno je dati odgovor primenom kompetitivnog radioimuno testa.

Tokom obavljanja preliminarnih ispitivanja kompetitivnim radioimuno testom, dobijeni su neobičajeni rezultati koji govore da jedno MAT, vezano za svoj epitop u strukturi SiŠ virusa, pojačava vezivanje drugih MAT za svoje epitope. Ovaj fenomen je već opisan i za neke druge viruse (Lemon and Ping, 1989). Pretpostavlja se da mehanizam ovog fenomena može da bude:

1. stabilizacija reakcije u okviru imunog kompleksa (antitelo-antitelo),
2. pojačavanje aviditeta unakrsnim reagovanjem bliskih molekula u strukturi virusa i
3. pojačavanje efiniteta usled indukcije odgovarajućih konformacionih promena u udaljenim antigenim situsima.

Prva mogućnost je malo verovatna, s obzirom na to da je obavljen test vezivanja pojedinačnih antitela jedno sa drugim, sa negativnim rezultatom. Druga mogućnost je takođe malo verovatna, pošto postoji mala verovatnoća da monoklonsko antitelo različito reaguje sa regionima proteina koji su normalno maskirani u strukturi virusa. Otuda je jedno od logičnih objašnjenja da oslobađanje epitopa „A“ (specifičnog za AG-1) nastaje kao posledica konformacionih promena u epitopu „B“ (specifičnog za AH-2) uslovljava pojačavanje reakcije unutar imunog kompleksa.

## LITERATURA

1. Barnett, P. V. et al. (1998), *Monoclonal antibodies, against O1 serotype foot-and-mouth disease virus, from a natural bovine host, recognize similar antigenic features to those defined by the mouse*. J. Gen. Virol. 79: 1687–1697.
2. Baxt, B. et al. (1989), *Characterization of anti-idiotypic antibodies generated against foot-and-mouth disease virus neutralizing monoclonal antibodies*. Viral Immunol., 2: 103–113.
3. Bolwell, C. et al. (1989), *Epitope mapping of FMDV with neutralizing monoclonal antibodies*. J. Gen. Virol, 70, 59–68.
4. Brown, F. (1985), *Antigenic structure of FMDV. Immunochemistry of viruses. The basis of serodiagnosis and vaccine*. Elsevier Sci. Publ. 265–279.
5. Butchaiah, G. and D. O. Morgan (1987), *Neutralization antigenic sites on type Asia-1 foot-and-mouth disease virus defined by monoclonal antibody resistant variants*. Virus Res. 52:183–194.
6. Crowther, J. R. et al. (1993), *Identification of a fifth neutralizable site on type O foot-and-mouth disease virus following characterization of single and quintuple monoclonal antibody escape mutants*. J. Gen. Virol. 74:1547–1553.
7. Dunn, C. S. et al. (1998), *The biological relevance of virus neutralization sites for virulence and vaccine protection in the guinea pig model of foot-and-mouth disease*. Virology 247, 51–61.
8. Gerhard, W. and Bachi, T. (1986), *Application of monoclonal antibodies in virology*. In: Handbook of experimental immunology, Vol. 4, Ch. 115, Ed. Weir, D. M.
9. Grubman, M. J. and Baxt, B. (2004), *Foot-and-Mouth disease*. Clinical Microbiol. Rev. 17(2) 465–493.
10. Harlow, E. and Lane, D. (1988), *Antibodies – Laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab. Pp. 288–318.
11. Laemmli, U. K. (1970), *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T*. Nature, London, 227, 680–685.
12. Lemon, S. M. and Ping, L. (1989), *Antigenic structure of Hepatitis A virus*, In: Molecular aspects of picornavirus infection and detection, p. 200. Eds. Samler, B. L. and Ehrenfeld, E. Am. Soc. Microbiol.
13. Letchworth, G. J. and Appleton, J. A. (1984), *Methods for the production of monoclonal antibodies*. USDA, Agriculture Handbook, p. 630.
14. McCullough, et al. (1987), *Epitopes on foot-and-mouth disease virus particles*. I. Topology. Virology 157, 516–525.
15. Stave, J. W. et al. (1986), *Analysis of FMDV type O1 Brugge neutralization epitopes using monoclonal antibodies*. J- gen. Virol. 67, 2083–2092.
16. Valčić, M. and Panjević, Đ. (1991), *Epitope mapping of foot-and-mouth disease virus C3 Resende subtype by means of a competition test using neutralizing monoclonal antibodies*. Acta Veterinaria, 41(5–6), 255–270.
17. Wagner, G. G. et al. (1997), *Immunochemical studies of FMDV. VII. Characterization of FMDV concentrated by polyethylene glycol precipitation*. Arch für die Gesamte Virusforschung, 30, 343–352.
18. Verdaguer, N. et al. (1998), *A Similar Pattern of Interaction for Different Antibodies with a Major Antigenic Site of Foot-and-Mouth Disease Virus: Implications for Intratypic Antigenic Variation*. J. Virol. 72(1), 739–748.