

УДК 616.155.194.8:546.72]-098-079

ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К РАСТВОРИМОМУ РЕЦЕПТОРУ ТРАНСФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГИБРИДОМНОЙ ТЕХНОЛОГИИ

О.Л. Пашкова

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий», Минск

Аннотация. Методом гибридомной технологии были получены моноклоны гибридных культивируемых клеток, стабильно продуцирующие высокоспецифические моноклональные антитела (МКА) к растворимому рецептору трансферрина (*sTfR*) человека. В ходе работы были получены три МКА, которые были способны распознавать как нативный, так и рекомбинантный *sTfR* на твердой фазе в прямом иммуноферментном анализе. Пара полученных антител позволила разработать собственный диагностический набор для количественного определения концентрации *sTfR* в плазме/сыворотке крови человека.

Ключевые слова: *sTfR* – гликопротеид, моноклональные антитела, имуноген, спленоциты, клетки гибридомы, рецептор трансферрина.

Введение. Классическим методом биотехнологии для получения моноклональных антител является гибридомная технология. Она позволяет создавать клеточные линии (гибридомы), синтезирующие МКА с заданной специфичностью к определенному эпитопу интересующего антигена/иммуногена.

Целью данной работы было получение мышиных моноклональных антител к растворимому рецептору трансферрина человека.

sTfR – гликопротеид с молекулярным весом 95 Кд, представляющий из себя экстраклеточную часть молекулы трансферринового рецептора, которая слущивается с поверхности клетки в результате протеолитического расщепления и поступает в кровоток, где образует в крови комплекс в 320 кДа с трансферрином, связанным с двумя атомами железа. Отщепленные мономеры *sTfR* можно определить в плазме или сыворотке [1].

В клинической практике изменение уровня *sTfR* в сыворотке связано с изменением скорости роста эритроидной ткани и/или запасов железа в организме. Результаты клинических исследований последних лет позволяют сделать вывод об уникальной диагностической ценности определения концентрации *sTfR*: 1) при чрезмерном повышении ферритина (воспалительные процессы) истинную потребность железа можно определить только при определении концентрации *sTfR*, 2) уровень *sTfR* соответствует «активной массе» эритропоэза, 3) при дефиците железа уровень ферритина и растворимого рецептора трансферрина изменяются разнонаправлено: ферритин снижается, *sTfR* повышается, 4) концентрация *sTfR* не реагирует на реакции острой фазы, острые нарушения функции печени или злокачественные новообразования, что позволяет проводить дифференциальную диагностику между железодефицитной и анемией хронических заболеваний.

Материалы и методы. Принцип получения моноклональных антител при гибридомной технологии – это соматическая гибридизация/слияние мышного В-лимфоцита, производящего нужные антитела, с клеткой миеломы, обладающей способностью к бесконечной пролиферации.

В качестве иммуногена использовался коммерчески доступный нативный белок растворимого рецептора трансферрина человека («Биалекса», РФ). Для иммунизации использовались 4 инбредные мыши линии Balb/c, самочки 6-8 недельного возраста, полученные из питомника Института биоорганической химии им. Шемякина-Овчинникова (Пущино, Россия).

Иммунизацию проводили по классической схеме, включающей в себя не менее трех внутрибрюшинных инъекций иммуногена в количестве 5-10 микрограмм в фосфатно-солевом буфере с pH 7,4 в присутствии полного адьюванта Фрейнда («Thermo Scientific», США) при первичной иммунизации и неполного при последующих [2,3]. Для оценки эффективности иммунизаций определяли наличие антител, специфических к sTfR, в плазме крови иммунизированных животных на 7-10 сутки от иммунизации в скрининге на антигене в прямом иммуноферментном анализе (ИФА) [4]. Анализ плазмы крови мышей показал наличие антител, специфичных к sTfR, и что с увеличением количества иммунизаций росло и количество выявляемых специфических антител, что делало возможным получение МКА.

Через месяц после 3-й иммунизации за 3 дня до планируемого слияния было проведено 3-х кратное бустирование иммуногеном в концентрации 10 микрограмм в фосфатно-солевом буфере с pH 7,4 внутрибрюшенно.

Следующий этап – это подготовка клеток к слиянию. Из селезенки иммунизированного животного извлекали спленоциты и отдельно готовили клетки мышевой плазматитомы X63/Ag8.653, дефицитной по ферменту гипоксантин-гуанин-fosфорибозилтрансферазе, не синтезирующей собственные антитела и находящейся в логарифмической стадии роста. В качестве сливающего агента использовался 50%-ный раствор полиэтиленгликоля 1500 («Merck», США), который стимулирует слияние мембран клеток и образование гибридных клеток, несущих в себе двойной набор хромосом. После слияния гибридомные клетки культивировали в селективной полной ростовой среде IMDM, содержащей гипоксантин, аминоптерин, тимидин («Sigma», США), которая позволяет выживать только гибридомам.

В наших экспериментах по слиянию мышевых В-лимфоцитов, иммунизированных растворимым рецептором трансферрина, было выявлено множество клонов, продуцирующих моноклональные антитела к sTfR человека. Скрининг первичных гибридомных клонов проводили методом прямого ИФА в планшетах с сорбированным на твердой фазе растворимым рецептором трансферрина и в отсутствие антигена на твердой фазе (для выявления неспецифического связывания). В связи с тем, что скорость роста гибридом, продуцирующих антитела, ниже, чем скорость роста «пустых» клонов, скрининг проводили сразу же после достижения клонами достаточного размера, примерно через 10 дней от гибридизации. И в течение 1-2 дней после скрининга положительные клоны по продукции антител клонировались методом лимитирующих разведений с контролем специфичности в прямой ИФА после каждого этапа клонирования. После успешного прохождения трёх этапов клонирования гибридомная линия считалась стабильной и наращивалась в культуральной среде в количестве, необходимом для заморозки клеток и получения у мышей асцитной жидкости, содержащей интересующие нас моноклональные антитела.

За 1-3 недели до инъекции клеток гибридомы, выращенных в культуре, мышам линии Balb/c, в возрасте 3-4-х месяцев, проводили интраперitoneальную инъекцию 0,5 мл пристана (2,6,10,14-тетраметилпентадекана) («Sigma», США). Затем каждой мыши вводили по 2×10^6 клеток моноклональной в фосфатно-солевом растворе с pH 7,4. После образования асцитной опухоли на 10-15-й день мышь забивали дислокацией шейных позвонков и отбирали асцитную жидкость. Клетки гибридомы осаждали центрифугированием. Полученный супернатант проверяли на наличие антител в прямой ИФА на антигене. Изотип полученных антител, содержащихся в асците, определяли методом ИФА с помощью набора анти-изотипических поликлональных крольчих антител против тяжелых цепей мышевых иммуноглобулинов – анти-IgG₁, анти-IgG_{2a}, анти-IgG_{2b}, анти-IgG₃, анти-IgM, анти-IgA. («Sigma», США) [4]. Скрининг показал, что в ходе проведенной гибридизации мы получили моноклональные антитела только изотипа G1.

Очистка антител изотипа G1 из асцитной жидкости проводилась методом аффинной хроматографии на колонке с белок-A-сефарозой («Amersham Biosciences», Швеция). Очищенные МАК были переведены в буферные растворы, оптимальные для хранения и последующего исследования. После очистки определяли концентрацию МАК с помощью набора реагентов для определения концентрации белка на основе бицинхониновой кислоты согласно инструкции производителя («ThermoScientific», США) и по методу M.Bradford; проверяли их специфичность в прямой ИФА на антигене, а также как контроль на овальбумине и бычьем сывороточном альбумине. Очищенные 3 моноклональных антитела были пробиотинилированы с помощью NHS-N-

гидроксисукцинида биотина («ThermoScientific», США) согласно инструкции производителя. Эффективность биотинилирования оценивали в прямом иммуноферментном анализе с иммобилизованным на твердой фазе sTfR. Полученные моноклональные антитела хранили при +4⁰С в присутствии 0,1% азода натрия или при -20⁰С в присутствии 50%-го раствора глицерина. Рабочая концентрация антител, как для хранения, так и для исследований составила 1 мг/мл.

Результаты исследования и обсуждение. В ходе проведенной гибридизации нами было получено 3 моноклональных антитела (2/7D, 2/12D, 3/3H), специфичных к растворимому рецептору трансферрина человека, как нативному, так и рекомбинантному, что было показано в прямой ИФА. Данные МАК в первую очередь рассматривались для создания собственной иммуноферментной тест-системы для определения концентрации растворимого рецептора трансферрина человека в плазме или сыворотке крови. Для этого были проверены разные варианты сочетаний жидкофазных и твердофазных антител. В результате был осуществлён подбор пар для «сэндвич»-ИФА из имеющихся 3 моноклональных мышиных антител к sTfR. В итоге получена только 1 пара твердофазных и жидкофазных антител для получения высокочувствительного «сэндвич»-варианта ИФА к sTfR человека, проведён подбор условий проведения данного варианта ИФА, разработана методика иммуноферментного анализа по определению концентрации растворимого рецептора трансферрина. Определение sTfR происходит за счет его взаимодействия с иммобилизованными на планшетах первыми моноклональными антителами мыши и вторыми биотинилированными антителами, находящимися в растворе. Образованный комплекс антиген-антитело выявляют с помощью конъюгата с пероксидазой хрина, ферментативную активность которой оценивают дальнейшей инкубацией с субстратом, дающим в результате реакции окраску раствора различной интенсивности.

Сравнительное измерение sTfR с использованием коммерческого набора фирмы «Quantikine IVD Soluble Transferrin Receptor ELISA («R&D Systems Inc.», США) показало, что наша тест-система не уступает по чувствительности коммерческой.

Заключение. Таким образом, в ходе данной работы была разработана и зарегистрирована, как изделие медицинского назначения, отечественная диагностическая тест-система «Набор реагентов для количественного определения растворимого рецептора трансферрина «Растворимый рецептор трансферрина-ИФА», предназначенный для количественного определения растворимого рецептора трансферрина в биологических жидкостях методом непрямого «сэндвич»-твердофазного иммуноферментного анализа на основе использования пары собственных моноклональных антител.

Список использованных источников

1. Beguin Y. Soluble transferring receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status // Clin. Chim. Acta. – 2003. – Vol. 329. – P. 9-22.
2. Антитела. Методы / Д. Кэтти [и др.]; под общ. Ред. Д. Кэтти. – М.: Мир, 1991. – Т.1. – 287 с.
3. Basic methods in antibody production and characterization / edited by G.C. Howard, D.R. Bethell. – Boca Raton: CRC Press, – 2000. – 271 p.
4. Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassays / Ed. By R.H. Burdon, P.H. Knippenberg. – Amsterdam. – 1985. – 549 p.