

Прикладные аспекты иммунологии

Получение и применение моноклональных антител

к.х.н., доцент кафедры
микробиологии
Герловский Денис Олегович

Минск, 2014

Как это было сделано?

Успех пришел, как всегда, неожиданно, как побочный продукт исследования, имевшего иные цели. В начале 70-х годов молодой немецкий иммунолог **Георг Кёлер**, получивший стипендию для работы в знаменитом Базельском институте иммунологии, заинтересовался вопросом о генетической изменчивости антител. В то время можно было ожидать, что антитела мутируют (генетически изменяются) с большей частотой, чем другие белки. Для исследования надо было изолировать клон АОК, продуцирующий антитела определенной специфичности, получить из него стабильную клеточную линию, поддерживаемую в пробирке (в культуре), и проследить, с какой частотой появятся там генетически измененные варианты. Для реализации проекта. Кёлер поехал в Англию, в лабораторию **Цезаря Мильштейна**, изучавшего клоны **плазмоцитом**, и они вместе разработали оригинальный подход к этой проблеме: решили получить гибрид нормальной АОК и опухолевой клетки. В случае успеха такой гибрид унаследовал бы от нормальной клетки способность к синтезу антител, а от опухолевой — бессмертие и способность к неограниченному и бесконтрольному росту. Это им удалось осуществить.

Проблемы получения моноклональных антител.

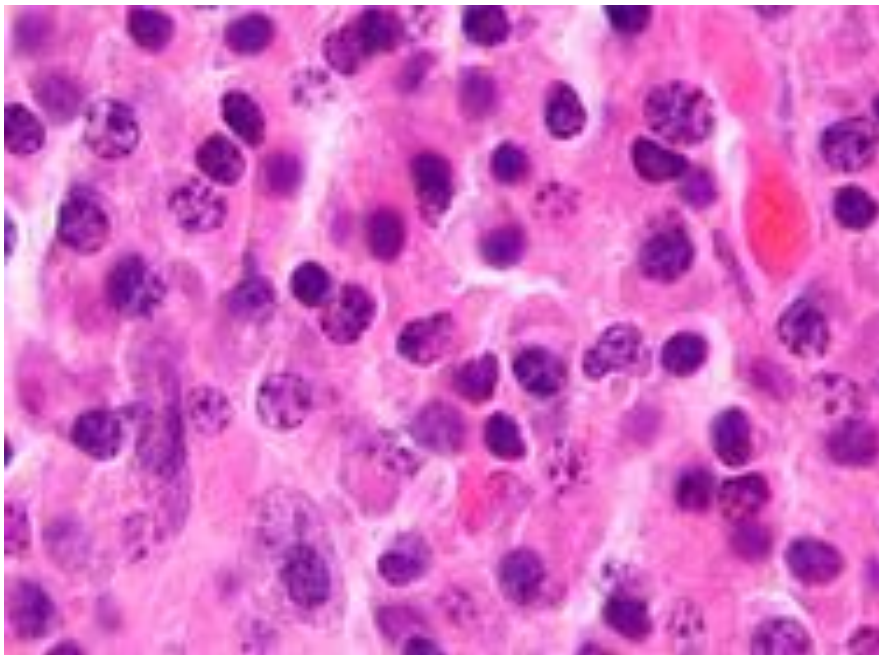
В организме в процессе созревания антителообразующих клеток (АОК) образуется большое количество — миллионы генетически однородных семейств клеток — клонов, **каждый из которых** специализируется на синтезе **только одного варианта** антител, и в этом причина большого разнообразия антител, индуцируемых даже одним антигеном. Таких клонов на много больше, чем требуется антител для распознавания любого, случайно взятого антигена. Антиген, попадая в организм, стимулирует размножение тех клонов, которые продуцируют антитела к его детерминантам.

Казалось бы, выход прост: надо вырастить отдельные клоны антителообразующих клеток в пробирке — в культуре тканей — и они будут продуцировать моноклональные антитела, то есть антитела одной строго определенной специфичности, продукт одного клона. Но и это оказалось невозможным: нормальные клетки смертны, вскоре после высаживания в культуру они погибают. Дело не доходит до образования клонов АОК. Добавление в культуру факторов роста несколько продлевает их жизнь, но тоже не решает проблемы.

Путь решения проблемы неожиданно указали злокачественные опухоли (плазмоцитомы).

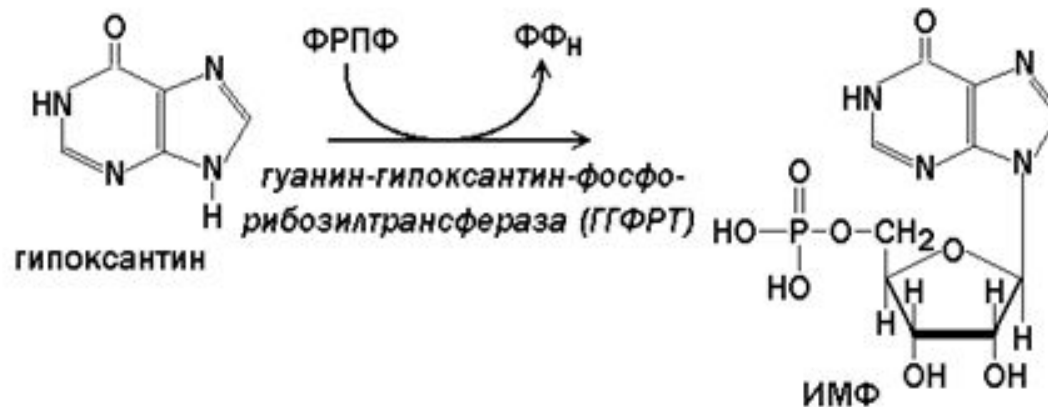
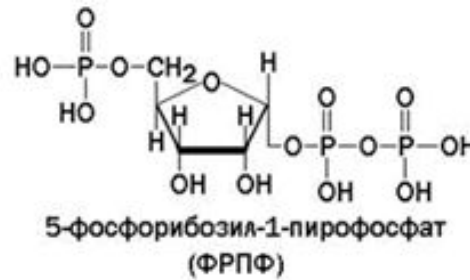
1. Известны опухоли у человека — плазмоцитомы, вырабатывающие и секретирующие в кровь иммуноглобулины, по структуре своей неотличимые от антител.
2. Плазмоцитома всегда или почти всегда сохраняет свойства и функции клетки, из которой произошла. Плазмоцитома происходит из "юных" плазматических клеток, то есть как раз из тех клеток, которые синтезируют антитела.
3. Они образуют строго однородный по всем свойствам моноклональный иммуноглобулин.
4. Опухоль, и в этом ее принципиальное отличие от нормальных предшественников, бессмертна. Ее можно культивировать в пробирке или пересаживать от одного животного другому неограниченное число раз и в течение неограниченного времени.
5. В отличие от нормальной ткани опухоль автономна, организм "хозяина" неспособен (за очень редкими исключениями) остановить неограниченный рост злокачественного опухолевого клона.
6. Плазмоцитомы возникают не только спонтанно, но их можно довольно легко индуцировать у мышей.

Миеломная болезнь, также известная как болезнь Рустицкого-Калера, множественная миелома или генерализованная плазмоцитома — злокачественная опухоль плазматических клеток, тип белых кровяных клеток обычно ответственных за производство антител. Заболевание системы крови, относящееся к парапротеинемическим лейкозам. Своё название заболевание и опухолевая клетка получили в связи с преимущественной локализацией процесса на «территории» костного мозга.

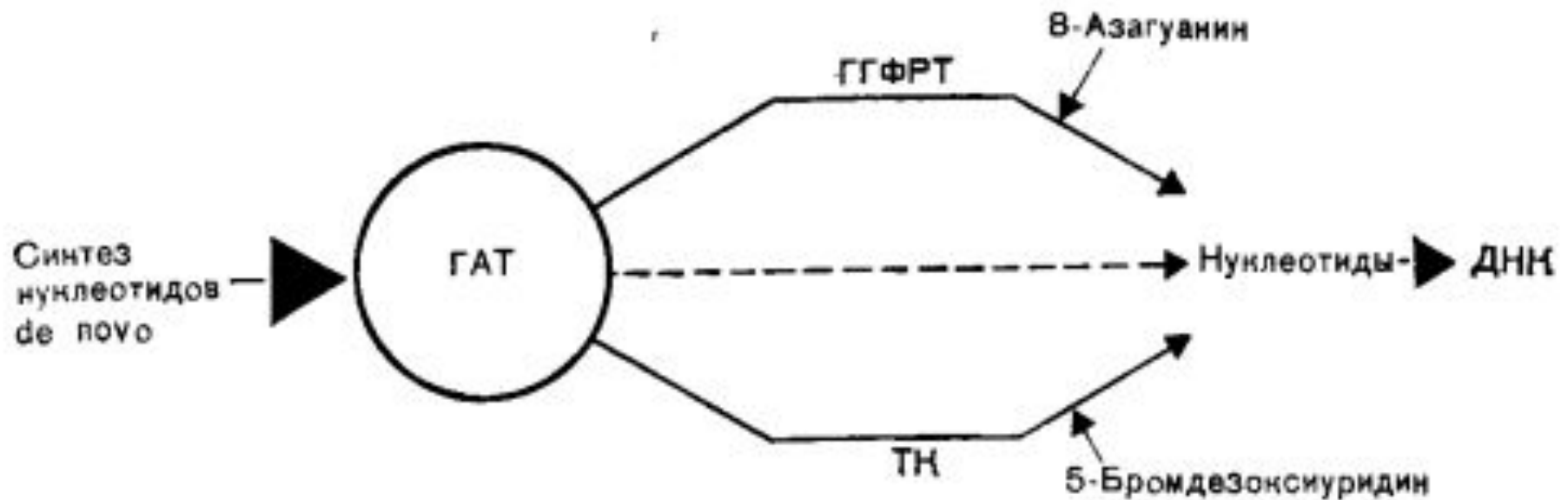


ГАТ-зависимая селекция.

Предпосылкой для ГАТ-зависимой селекции является наличие вариантов плазмоцитомных клеток, дефектных по гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазе (ГТФРТ) или по тимидинкиназе (ТК). Эти клетки отмирают в культуральной среде, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин (ГАТ), поскольку не обладают способностью обойти аминоптериновый блок основного пути биосинтеза ДНК за счет биосинтеза гипоксантина и тимидина.



Дефектные по ГГФРТ линии плазмоцитом получают путем селекции клеток, резистентных к 8-азагуанину. Линии, дефектные по ТК, выделяют по резистентности к 5-бромдезоксимуридину. Все клетки, способные усваивать Г и Т, включали их токсичные аналоги и погибали. Выживали лишь те редкие мутанты, которые были неспособны усваивать Г и Т, то есть были лишены резервного пути. Из потомства этих клеток дополнительно отбирали еще и такие мутанты, которые утратили способность к синтезу собственных иммуноглобулинов.



Получение антителообразующих лимфоцитов

В дальнейшем речь пойдет только о слиянии клеток плазмоцитомы мыши с лимфоцитами того же вида. Слияние клеток плазмоцитомы и лимфоцитов человека или крысы имеет свои особенности. Для иммунизации используют инбредные линии мышей, сингенные, по отношению к плазмоцитоме или аллогенным штаммам. В последнем случае для лучшего роста гибридных клеток после слияния следует использовать гибриды F1 мышей BA1B/C и мышей, иммунизированных с целью выделения у них нормальных клеток селезенки. Для культивирования гибридом *in vivo* также необходимо использование гибридов F1. Для проведения иммунизации подходят любые схемы, стимулирующие образование выраженного гуморального иммунного ответа.



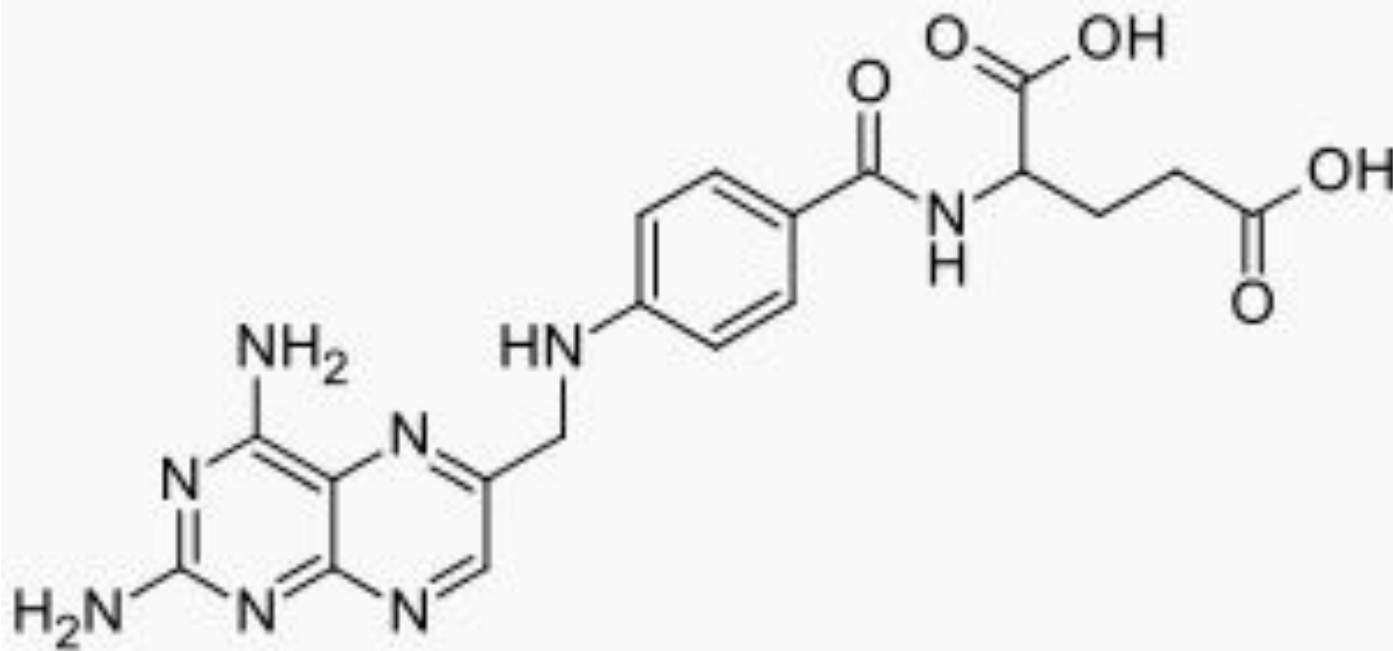
Получение клеток.

Мышей забивают цервикальной дислокацией, извлекают в условиях стерильности селезенку и готовят суспензию отдельных клеток. Клетки селезенки трижды отмывают средой для слияния, не содержащей сыворотки. Используют суспензию, содержащую $2 \cdot 10^7$ лимфоцитов. Если число лимфоцитов меньше предусмотренного, то к суспензии добавляют еще $2 \cdot 10^8$ ядерных клеток селезенки.

Слияние клеток.

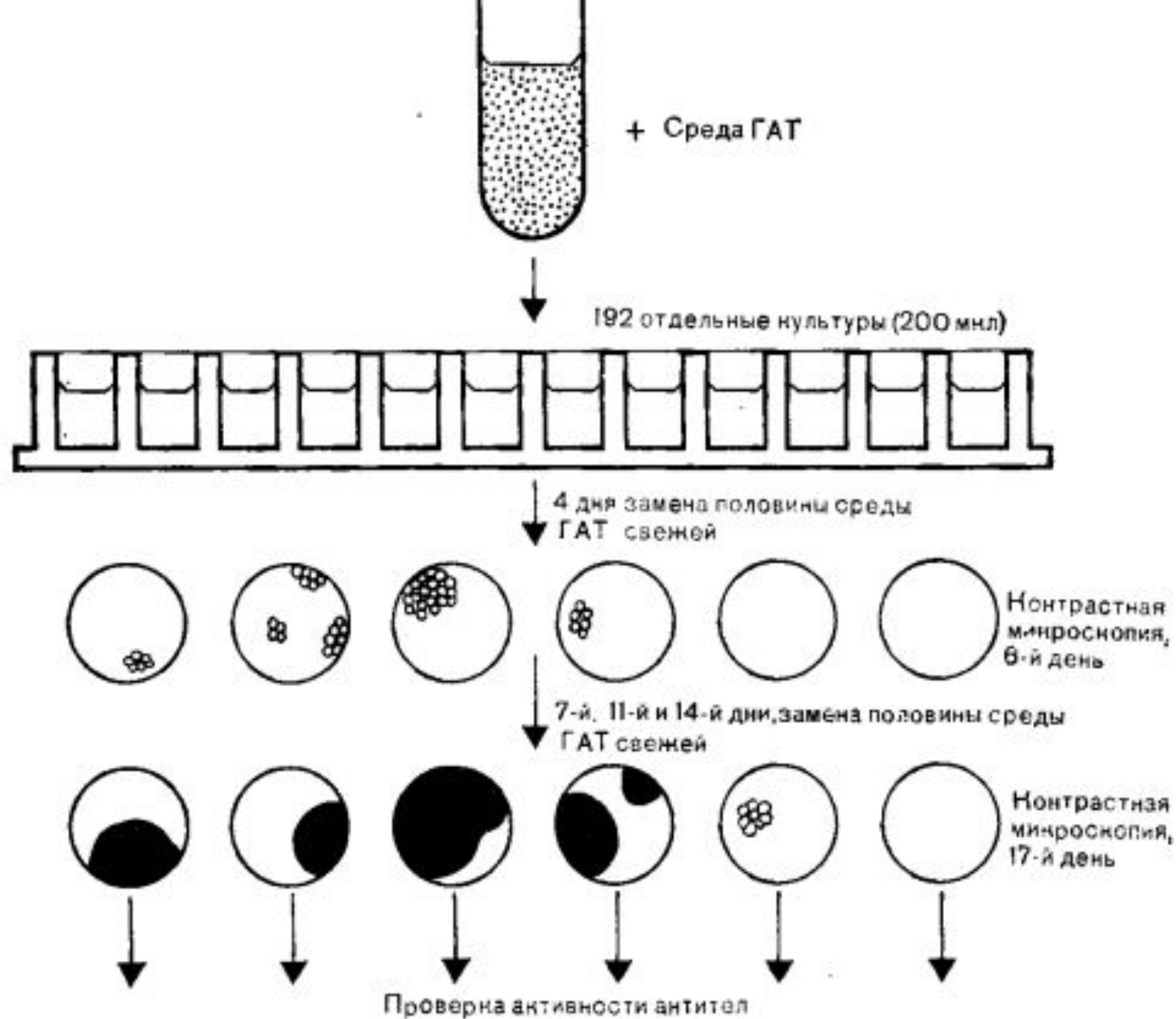
Плазмоцитомные клетки в количестве $2 \cdot 10^7$, взятые в логарифмической фазе культивирования дважды отмытые культуральной средой для слияния, добавляют к отмытым клеткам селезенки мыши. Суспензию клеток тщательно перемешивают и центрифугируют при 300 g. После удаления надосадочной фракции осадок ресуспендируют в небольшом количестве среды. Затем в течение 2 мин по каплям добавляют 1 мл раствора полиэтиленгликоля (ПЭГ). Избыток ПЭГ разводят добавлением бессывороточной среды для слияния. Добиваются равномерного распределения клеток во всем объеме жидкости. Клетки собирают центрифугированием при 300 g, надосадочную фракцию отбрасывают. Все процедуры проводят в условиях минимальной обсемененности микробами (в ламинарном боксе) при комнатной температуре.

Имеются два пути синтеза предшественников нуклеиновых кислот: основной и резервный. Основной — это путь новообразования нуклеотидов, звеньев, входящих в состав нуклеиновых кислот. Этот путь включает несколько этапов и блокируется противоопухолевым препаратом аминоптерином (А). Однако клетки не гибнут от этого препарата, поскольку обладают резервным путем - способностью синтезировать нуклеотиды и нуклеиновые кислоты, реутилизирова продукты распада ранее синтезированных нуклеиновых кислот: гипоксантина (Г) и тимидина (Т). Добавление Г и Т в питательную среду, содержащую А, снимает токсический эффект последнего.



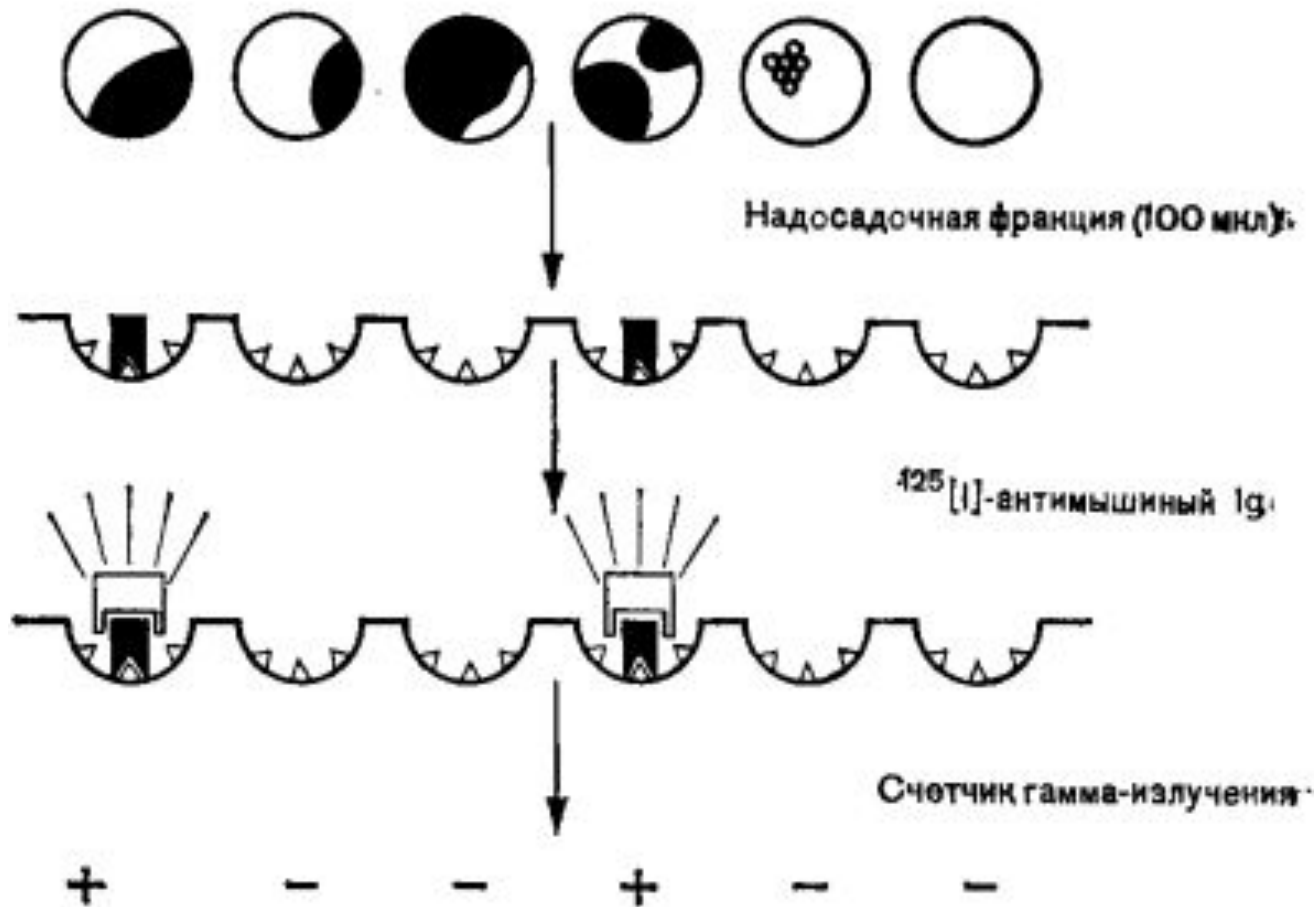
Селекция гибридных клеток на среде ГАТ

Слившиеся клетки аккуратно ресуспендируют в 40 мл среды ГАТ. К этой суспензии для поддержания роста добавляют 10^7 свежевыделенных ядерных клеток селезенки. Из суспензии клеток отбирают 192 пробы по 200 мкл и вносят их в плоскодонные планшеты для микрокультуральных работ. Культуры клеток инкубируют в водонасыщенной атмосфере, содержащей 5% CO_2 при 37 °С. Начиная с 4-го дня после слияния, производят замену половины надосадочной фракции в лунках с культурой свежей порцией среды ГАТ; замену повторяют каждые 3 или 4 дня. Для этого половину надосадочной фракции клеточной культуры аккуратно декантируют стерильными пастеровскими пипетками, соединенными с водоструйным насосом.

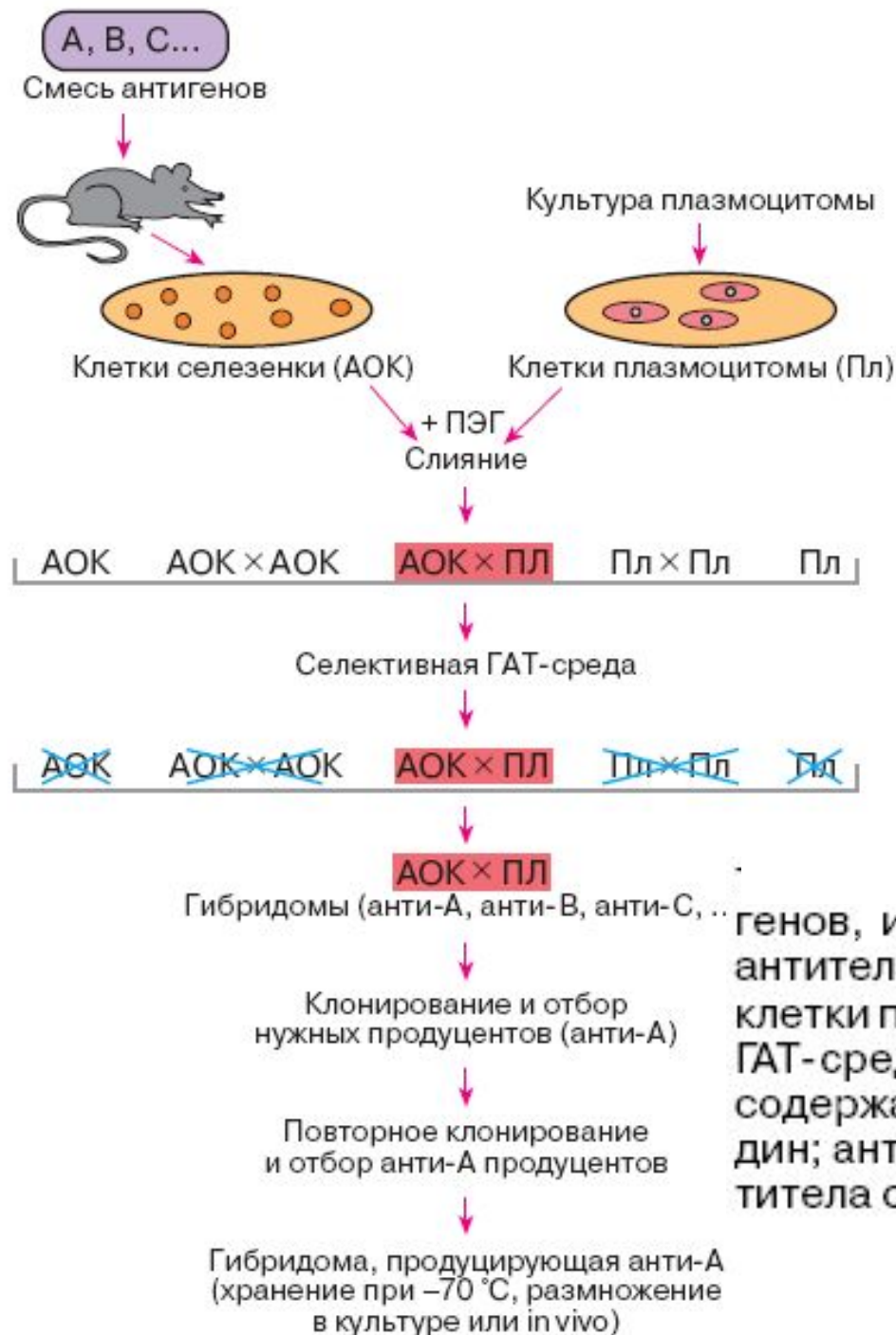


Определение антителопродуцирующей способности гибридом

При обычных условиях культивирования через 2—3 нед количество клеток в гибридном клоне достигает величины, делающей возможной определение антител. Из культуральных лунок отбирают при помощи автоматической пипетки по 50 мкл надосадочной фракции. Для обнаружения антител можно использовать любой высокочувствительный метод.

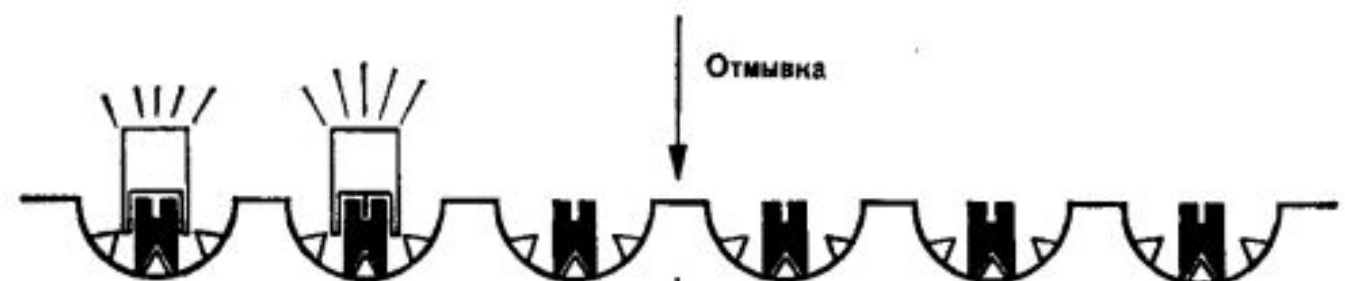
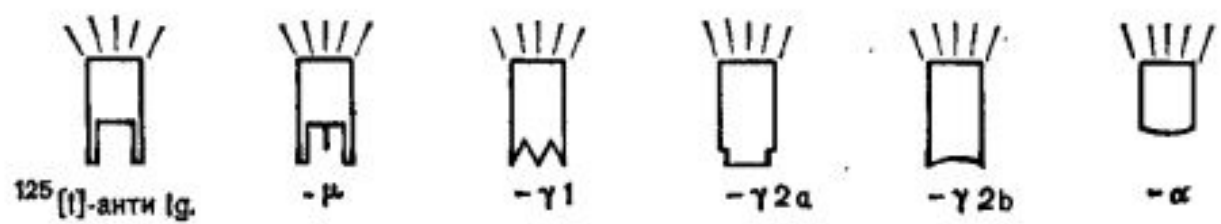
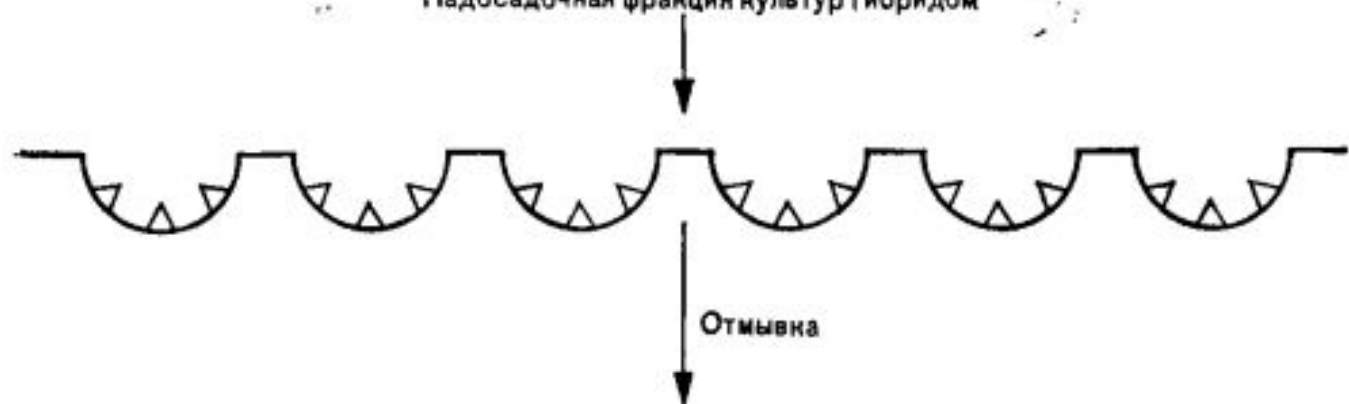


Следующий этап после получения гибридом — клонирование и отбор нужных клонов. Выжившие в ГАТ клетки рассеивали в специальные пластиковые планшеты, содержащие обычно 96 лунок емкостью примерно по 0,2 см³. В каждую лунку помещали в среднем по 10 гибридомных клеток, которые культивировали в присутствии "кормящих" клеток, не имеющих отношения к гибриdomам, но способствующих их росту. После нескольких дней культивирования содержимое каждой лунки проверяли на присутствие антител нужной специфичности. Для этого использовали микрометоды выявления антител к соответствующему антигену. Клетки из лунок, содержащих нужные антитела, клонировали, то есть повторно рассеивали по таким же лункам, но из расчета 1 клетка на лунку, вновь культивировали и проверяли на присутствие нужных антител. Процедуру повторяли 1—2 раза. Таким образом, отбирали клоны, продуцирующие антитела только одной нужной специфичности, то есть моноклональные антитела.



А, В, С – многокомпонентная смесь антигенов, использованная для иммунизации; АОК – антителообразующие клетки селезенки; Пл – клетки плазмоцитомы, не растущие в селективной ГАТ-среде; ПЭГ – полиэтиленгликоль; ГАТ – среда, содержащая гипоксантин, аминоптерин, тимидин; анти-А, анти-В, анти-С – моноклональные антитела соответственно к А-, В-, С-антигенам

Надосадочная фракция культур гибридом



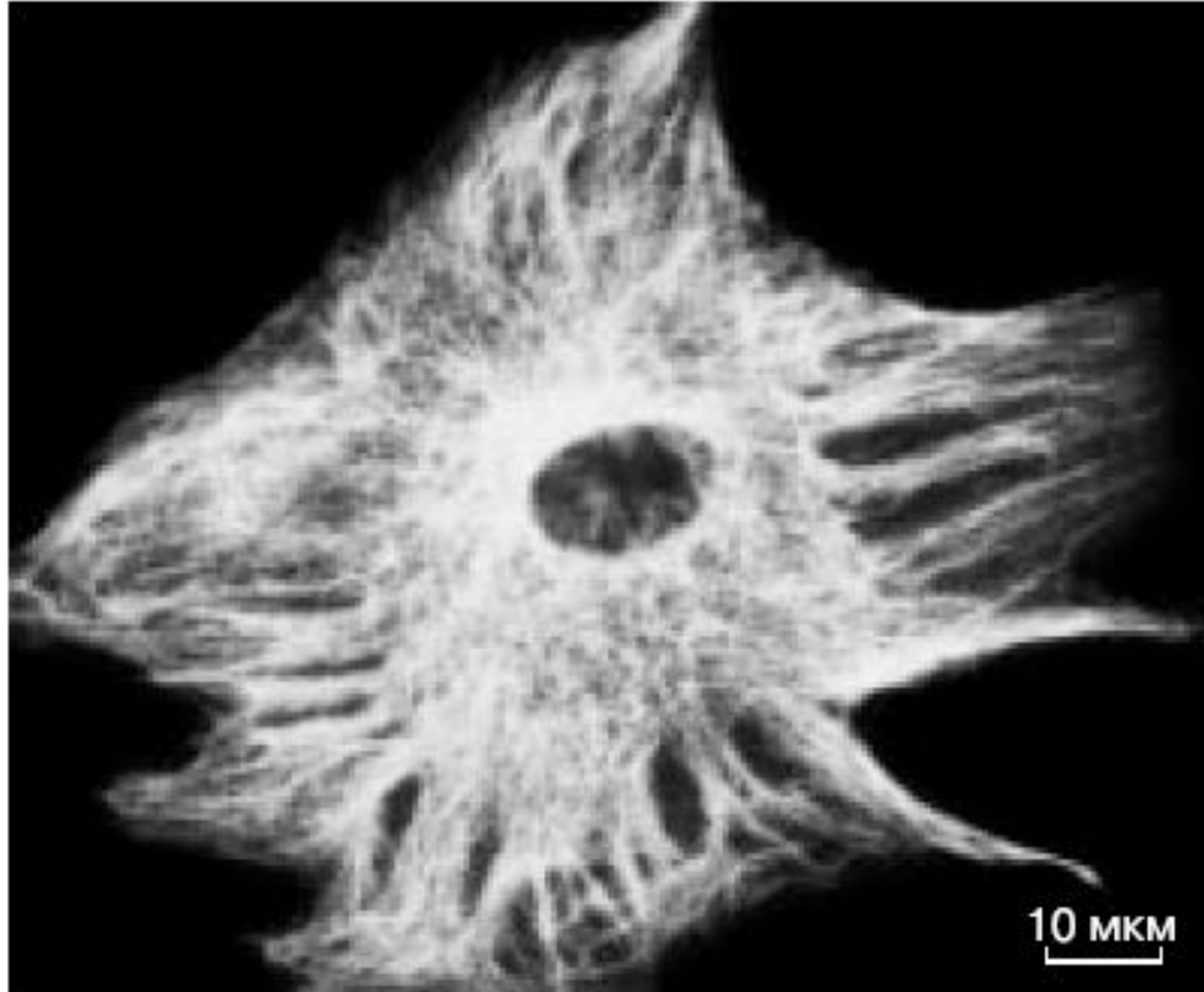
Счетчик гамма-излучения

+ + - - - -

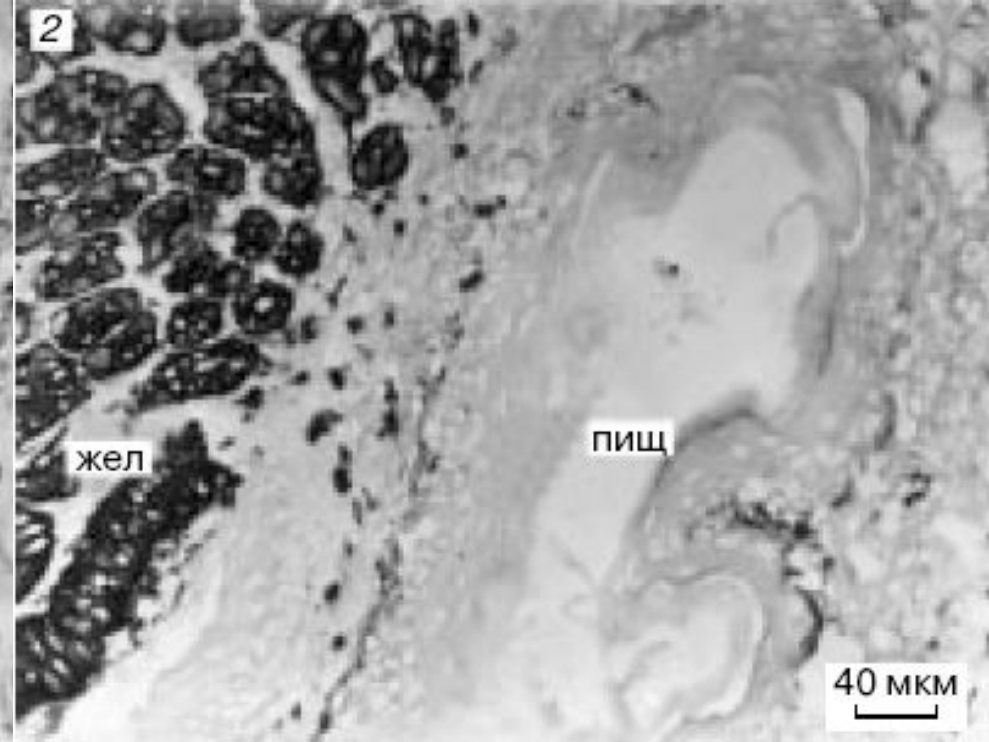
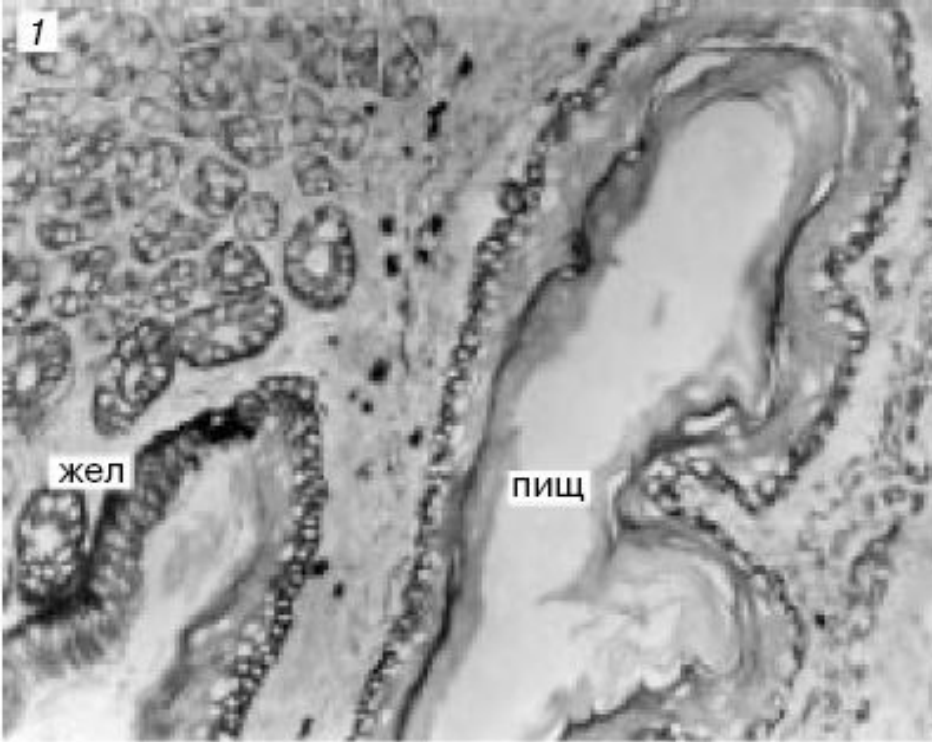
Определение класса (субкласса) гибридомных АТ при помощи меченных ^{125}I -антител к иммуноглобулинам.

Применение

Обычные поликлональные антитела давно и широко применяются для определения биологически активных веществ - белков крови и других биологических жидкостей, гормонов, ростовых факторов, клеточных рецепторов, медиаторов воспаления и иммунитета, бактериальных и вирусных антигенов, различных ядов и т.п. Моноклональные антитела из-за высочайшей специфичности, стандартности и технологичности получения успешно вытесняют и заменяют иммунные сыворотки.



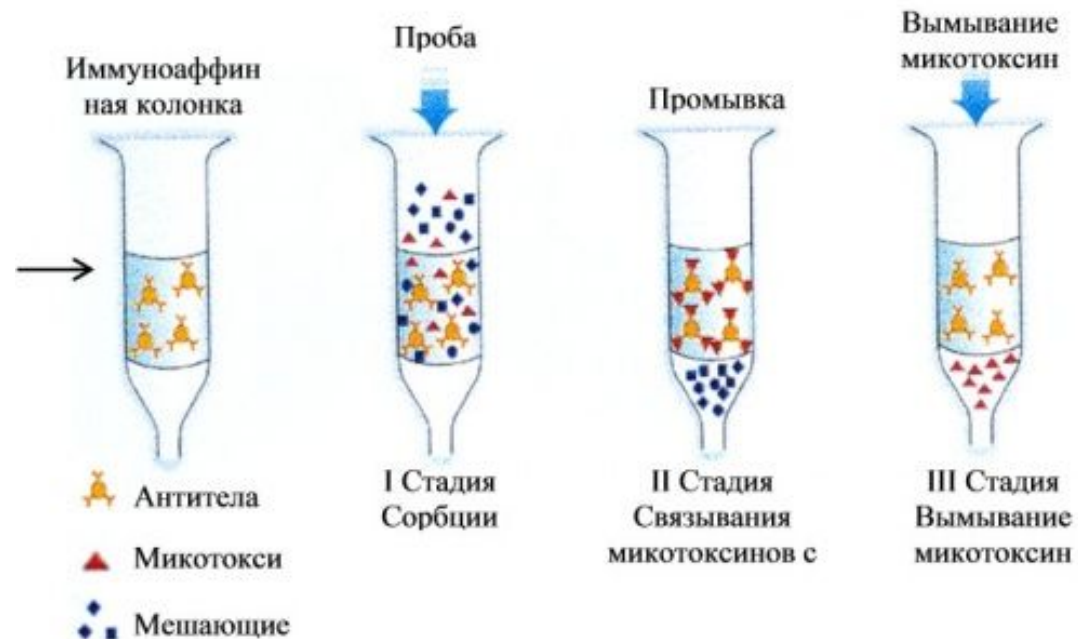
Иммунофлуоресцентное окрашивание клетки соединительной ткани (фибробласта) моноклональным антителом к тубулину – белку микротрубочек, образующих скелет клетки



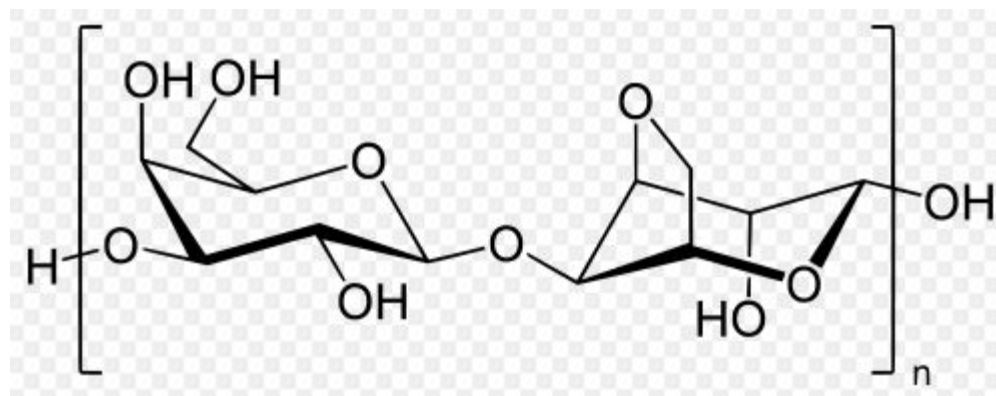
Последовательные срезы через желудок (жел) и пищевод (пищ) мыши, окрашенные двумя моноклональными антителами: 1 - первое моноклональное антитело реагирует с эпителием пищевода и слабее с эпителием желудка; 2- второе моноклональное антитело реагирует только с эпителием желудка

Иммуноаффинная хроматография

Пропускают белковый раствор, содержащий исследуемый антиген. Большинство макромолекул проходит через частицы носителя не задерживаясь, в то время как между антителами, иммобилизованными на носителе, и антигеном, содержащимся в растворе, образуется иммунный комплекс. После отмывки носителя от не связавшихся белков иммунный комплекс разрушают, пропуская через носитель растворы с низкими (pH 2,0 – pH 4,0) или высокими (pH 11,0 – pH 12,0) значениями pH, либо растворы с высокой ионной силой (2M NaCl), либо растворы, содержащие хаотропные соединения (KSCN). При этом исследуемый белок элюируют с носителя, его собирают и переводят в оптимальный для хранения данного белка буфер.

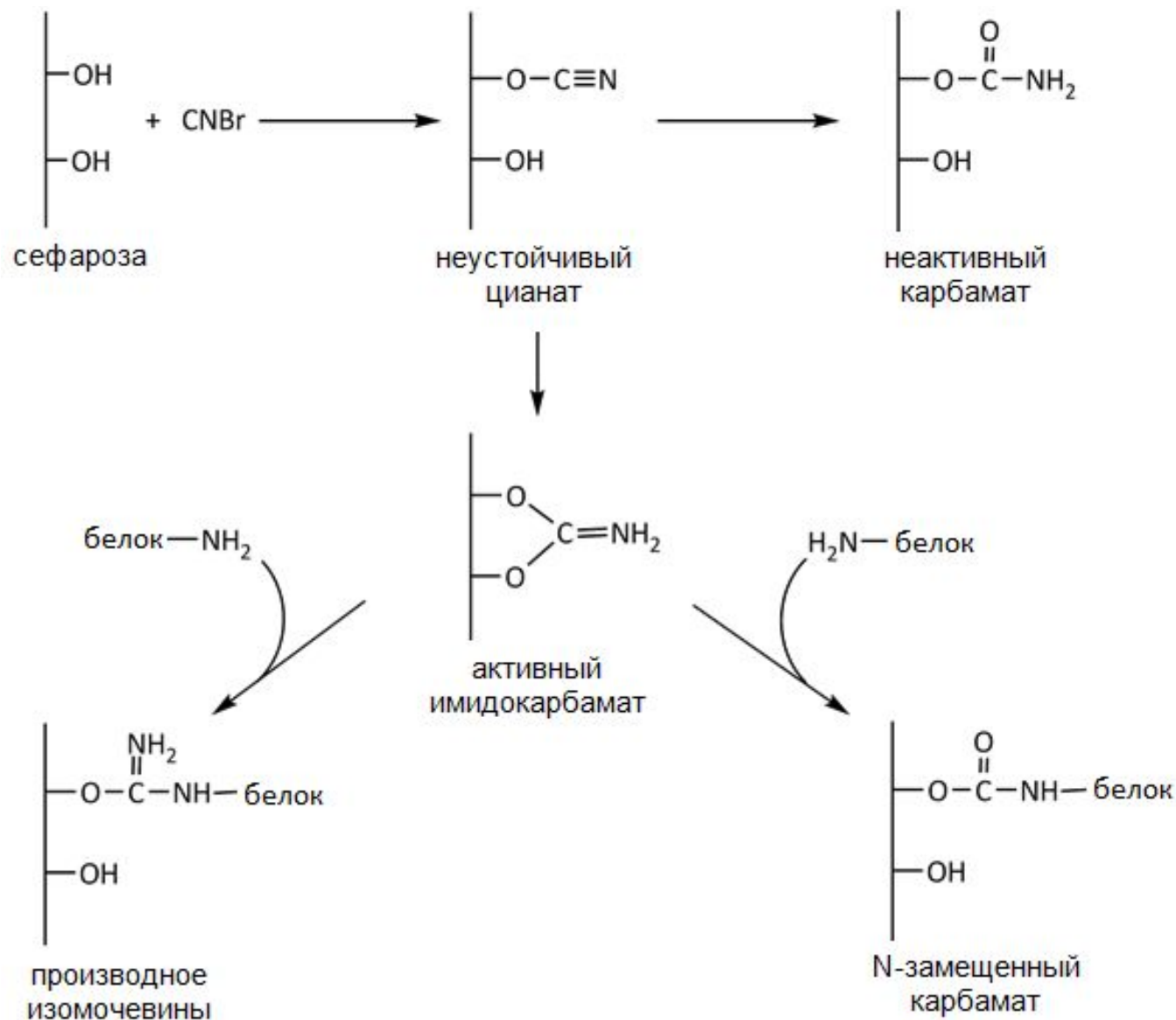


Одним из наиболее распространенных носителей, используемых в биохимии уже на протяжении нескольких десятилетий, является сефароза – специальным образом обработанные сферические гранулы агарозы. Известно несколько способов активации сефарозы, однако чаще других применяют метод активации сефарозы с использованием бромциана (BrCN). Преимуществом данного метода является простота, высокая устойчивость образующихся связей, стабильность сефарозы в довольно широком диапазоне pH (от 2,0 до 12,0). Относительная жесткость и крупные размеры частиц сефарозы позволяют использовать такие носители в колоночной хроматографии при достаточно высоких скоростях подачи растворов на колонку.

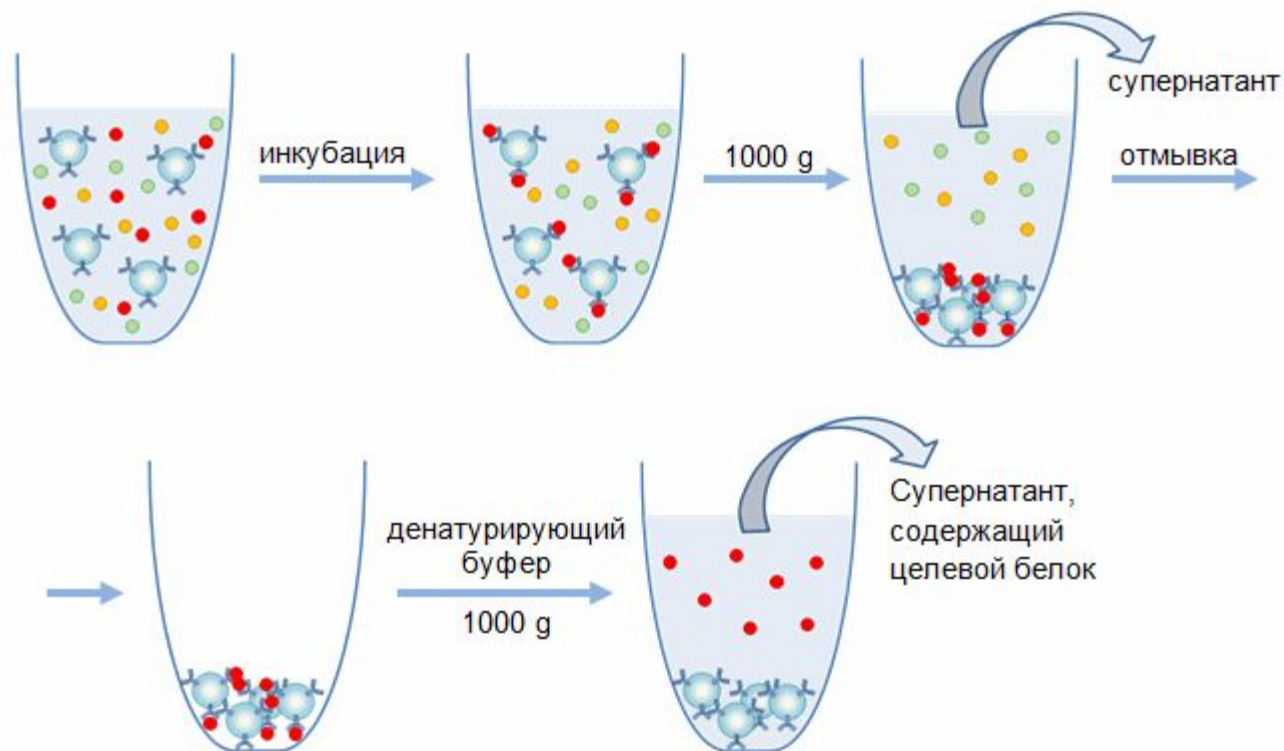


Активацию сефарозы осуществляют в процессе инкубации раствора бромциана с водной суспензией сефарозы. Бромциан взаимодействует с гидроксильными группами сефарозы, в результате чего образуется имидокарбонат, содержащий электрофильный атом углерода. Помимо этого в ходе реакции образуется неактивный карбамат, не способный к реакции с нуклеофильными боковыми группами аминокислот. При взаимодействии имидокарбоната с нуклеофильными группами, прежде всего с ϵ -аминогруппами лизина, происходит образование прочной ковалентной связи белка с активированной матрицей через остаток изомочевины или N-замещенного карбамата. Реакция активации матрицы бромцианом проходит только в щелочной среде с выделением бромистоводородной кислоты, для нейтрализации которой требуется постоянное добавление щелочи к реакционной смеси. Реакция бромциана с гидроксилами матрицы экзотермична, поэтому ее проводят на ледяной бане. Нужно заметить, что активными нуклеофилами, кроме ϵ -аминогрупп лизина, являются также SH-группа цистеина, концевые аминокислотные группы белков и OH-группа тирозина (по активности данные группы располагаются в следующем порядке: SH- > концевая NH₂- > OH-группа тирозина). С другой стороны, тиоэфиры менее прочны, чем кислородные эфиры, а последние уступают по прочности амидным связям.

Схема иммобилизации белка на BrCN-активированной сефарозе

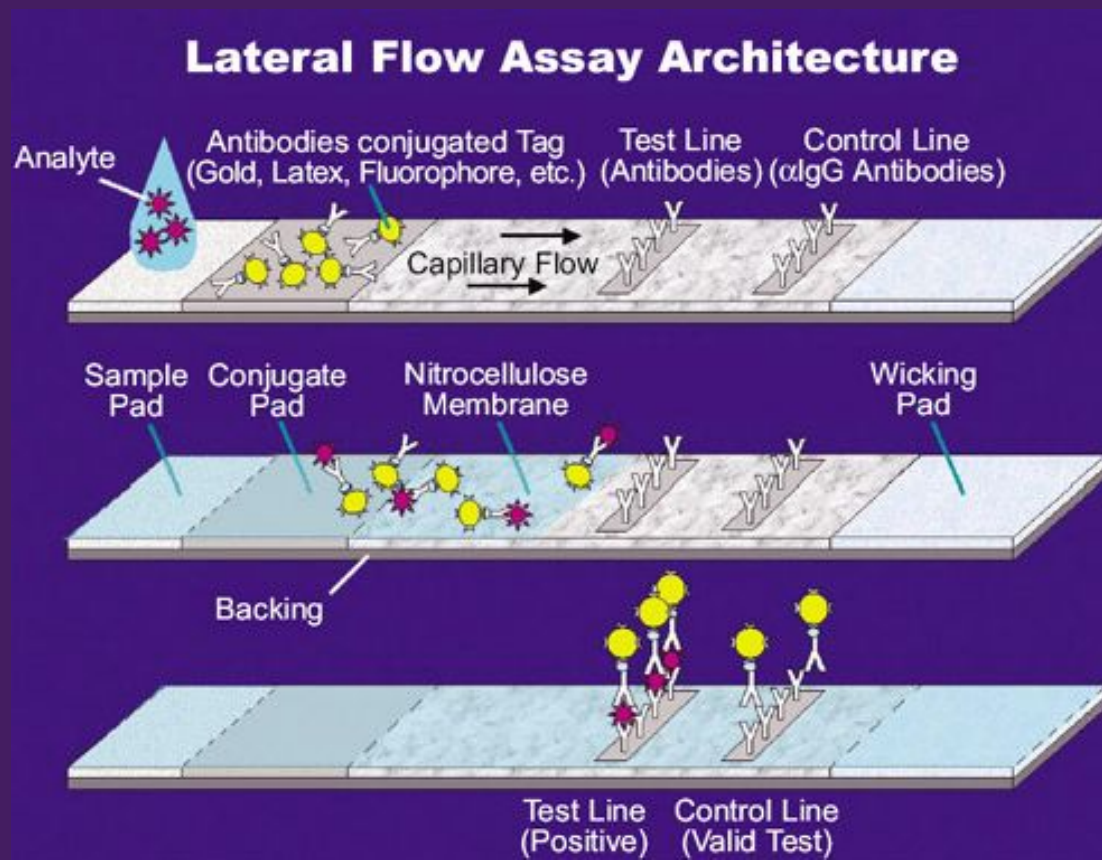


Второй способ экстракции исследуемого белка из сложной смеси – **иммунопреципитация**, или экстракция в объеме. Иммунопреципитацию используют при работе с незначительными (нано- и микрограммы) количествами вещества. При этом объем аффинного носителя обычно не превышает сотен микролитров, а объем исследуемого образца – нескольких миллилитров. То есть, иммунопреципитацию используют в тех ситуациях, когда из-за малого количества исследуемого вещества оказывается технически сложным создать адекватную по размерам аффинную колонку.



Иммунохроматографический анализ (ИХА) — иммунохимический метод анализа, основанный на принципе тонкослойной хроматографии и включающий реакцию между антигеном и соответствующем ему антителом в биологических материалах. Проводится с помощью специальных тест полосок, панелей или тест кассет.

Метод прямого ИХА используется для выявления высокомолекулярных соединений – вирусов, в т.ч. ВИЧ; различных гормонов (например, в тестах на беременность), возбудителей инфекционных заболеваний.



Метод конкурентного ИХА, используемый для определения низкомолекулярных соединений, основан на конкуренции аналита и иммобилизованного конъюгата аналит:белок-носитель за ограниченное количество центров связывания специфических антител, содержащихся в конъюгате Ат-метка. При нанесении образца, содержащего аналит, он связывается с конъюгатом Ат-метка на мембране с конъюгатом. Далее иммунокомплекс проходит через тестовую зону, где иммобилизован конъюгат аналит:белок-носитель. Иммунокомплекс не может связаться с этим конъюгатом из-за стерических затруднений: низкомолекулярные соединения обычно имеют одну антигенную детерминанту и, соответственно, антитела имеют один центр связывания с антигеном, который уже является занятым аналитом. Далее иммунный комплекс связывают антивидовые антитела, находящиеся на контрольной линии.



В качестве меток в ИХА используются различные частицы, обладающие следующими свойствами:

1. Красящие вещества (нано-частицы коллоидного золота или углерода, или частицы окрашенного латекса). В этом случае используется визуальная детекция результата, либо приборное колориметрическое определение (или сканирование). Наиболее часто используемой меткой является нано-частицы коллоидного золота.

2. Флуоресцентные, фосфоресцентные и биолюминисцентные метки, ковалентно связанные с частицами латекса.

3. Парамагнитные метки (также закрепленные на частицах латекса). Данный вид меток используется в ИХА с применением приборов, регистрирующих силу магнитного поля.

4. Ферментные метки используются по тому же принципу, что и в ИФА. Ферментативная реакция регистрируется с помощью окрашивания субстратов, и результат анализа является визуальным, или считывается с помощью ридера.

5. Новым направлением в разработке различных разновидностях ИХА является использование липосом в качестве носителей различного рода меток (красящих, флуоресцентных, ферментативных, электроактивных и пр.).

Спасибо за внимание