

О ВОЗМОЖНОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ С ПОМОЩЬЮ ИММУНИЗАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА *in vitro*

Т. К. ДАВТЯН*, Б. Х. НИСМАН**, Ю. Г. АЛЕКСАНИАН*, Т. Н. ИГИТОВА**

Армянский НИИ эпидемиологии, вирусологии и медицинской паразитологии
и А. Б. Алексаняна, Ереван*, Институт цитологии АН СССР, Ленинград**

Показано возможность использования иммунизированных лимфоцитов человека для получения гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к растительному белку—фикобилину.

Ցույց է արված մարդու in vitro իմունիզացիալ քիմիոթերապիայի օգտագործման հարավորությունը բուսական սպիտակուց ֆիկոբիլինի հանդեպ մոнокլոնալ հակամարմիններ արտադրող հետերոհիբրիդաներ ստանալու համար:

The possibility of use of human immunized lymphocytes *in vitro* is shown for producing monoclonal antibody by hybridomas.

Гибридомы—моноклональные антитела—иммунизированные лимфоциты.

Предложенный в 1975 г. метод получения гибридных клеток, продуцирующих моноклональные антитела [14], получила чрезвычайно широкое применение во многих областях современной биологии и медицины для диагностики инфекционных, онкологических и других болезней, изучения локализации антигенов, выяснения структурной организации и принципов функционирования биологических макромолекул—пептидов, белков, нуклеиновых кислот, для получения очищенных препаратов биологически активных соединений и т. д. [4, 21, 24]. Следует отметить, что все гибридомы, за единичными исключениями, имеют мышинное происхождение, поэтому применение моноклональных антител в целях иммунотерапии у человека крайне ограничено ввиду угрозы развития аллергических реакций к мышинным иммуноглобулинам [2]. В связи с этим весьма актуальным является выяснение возможности получения гибридом, продуцирующих человеческие моноклональные антитела. Данное направление исследований является одним из важнейших в современной иммунологии и клеточной биологии.

В настоящее время известны по крайней мере три типа человеческих гибридом, продуцирующих моноклональные антитела: 1) гибридомы человек—человек; 2) гибридомы человек—мышь; 3) гибридомы, полученные на основе гетеромисцеломы человек—мышь [11, 13, 15, 23]. Для получения гибридом всех перечисленных типов в качестве одного из партнеров используются лимфоциты, полученные от больных людей или иммунизированные вне организма [6, 8, 17, 19, 25].

Сокращения: МНКЧ—моноклоналы периферической крови человека, Лей-ОМ—метилловый эфир L-лейцина, ИЛ-2—интерлейкин-2, γ -ИПФ— γ -интерферон, РИИФ—реакция прямой иммунофлюоресценции, МЛ—митоген лактоза.

Целью настоящей работы являлось выяснение возможности использования лимфоцитов периферической крови человека, иммунизированных *in vitro* по различным схемам, для получения гибридом человек—мышь, секретирующих человеческие моноклональные антитела.

Материал и методы. С помощью центрифугирования и градиенте плотности Гораи Р-диге (Gorall Svedero) получали МПКЧ. С помощью центрифугирования при 1200 об/мин в течение 10 мин клетки трижды отмывали забуференным физиологическим раствором (рН 7,5). Для обработки МПКЧ Лей-ОМе клетки в количестве 10⁷–10⁸ в 1 мл (общий объем клеточной суспензии—10 мл) среды RPMI-1640, содержащей 2,5 мМ Лей-ОМе, инкубировали при комнатной температуре в течение 40 мин [5]. Клетки отмывали центрифугированием дважды средой RPMI-1640, содержащей 2% перманганат калия, инкубировали при 37° в течение 40 час с антигеном — белок IV группы (АВ). При проведении экспериментов в качестве антигена использовали белок растительного происхождения—фикобилин. Иммунизацию *in vivo* проводили в 24 суток на платках на опитанной в литературе методике [5]. Клетки, обработанные Лей-ОМе, в количестве 3,5·10⁶ ресуспендировали в 2 мл среды RPMI-1640, содержащей 50 мМ 2-меркаптоэтанол, 10% человеческой сыворотки IV группы, 10 ЕД/мл рекомбинантного ИЛ-2, 100 ЕД/мл м-ИИФ, антиген (фикобилин) в концентрации 1–2 мкг/мл в 25% супернатанте облученных (2000 R) мышей линии Т-лимфоцитов, сывороткой и МЛ по описанной методике [8]. Клетки инкубировали в течение 6 дней при 37° в атмосфере, содержащей 6% CO₂. Клеточную массу на 7 день отмывали центрифугированием и использовали в экспериментах по получению клеточных гибридов. Соматическую гибридизацию проводили по описанной методике [12]. В качестве одного из партнеров использовали полученную в лаборатории генетики клеток мышьяком дифференцировки и малинизации клеток Ив-та цитологии АН СССР линию клеток SPEER-5 [1]. 25·10⁵ иммунизированных *in vitro* МПКЧ смешивали с 10⁶ клеток мышьяком мализированной SPEER-5. Клетки были отмыты центрифугированием трижды в среде RPMI-1640. Осадок ресуспендировали в 1,5 мл 15%-ного раствора поливинилпирролилона с ММ 1000 (Merck) и подвергали 10% диметилсульфоксиду, инкубировали в течение 1 мин, в течение же следующей минуты в пробирку добавляли 1 мл среды RPMI-1640, доводя объем до 20 мл. Клеточную суспензию центрифугировали, осадок ресуспендировали в RPMI-1640, содержащей 10% абомональней телячьей сыворотки и компоненты селективной среды: 0,4 мМ ампицилин, 16 мМ тимидин, 100 мМ гипоксантин и 1 мкг/мл бромистого этидия (ГАГ+БЭ). Клетки высевали в лунки 96-луночных плат по 3·10⁴/мл и инкубировали в термостате с поддувом CO₂. В процессе культивирования время от времени собирали супернатанты из лунок с позитивным ростом клеток для тестирования специфических антигенов и определения классов человеческих иммуноглобулинов с использованием метода иммуоферментного анализа. С целью определения действия Лей-ОМе на различные субпопуляции лимфоцитов человека, а также для изучения влияния иммуноглобулинов на поверхности гибридных клеток использовали РНИФ [20].

Результаты и обсуждение. Изучали влияние Лей-ОМе на различные субпопуляции иммунокомпетентных клеток с помощью РНИФ с использованием моноклональных антител против различных маркеров человеческих лимфоцитов и Fab-фрагментов кроличьих эпитимы-шинных антител, меченных ФИТЦ. Препараты моноклональных антител любезно предоставлены А. Ю. Барышиным (ВОНЦ АМН СССР). Результаты проведенных экспериментов представлены в табл. 1.

Из приведенных данных видно, что на 6 день культивирования лимфоцитов человека после обработки Лей-ОМе обнаруживается уменьшение процентного содержания натуральных киллеров и цитотоксиче-

Таблица 1. Влияние Лей-ОМе на различные субпопуляции лимфоцитов человека

Культура лимфоцитов	Натуральные киллеры	Видетокс	Т-хелперы CD4 ⁺ CD8 ⁻	Г-клетки (Т-супрессоры CD8 ⁺ CD4 ⁻)
МПКЧ	20±8	13±4	22±7	41±12
МПКЧ+Лей-Оме	10±4	19±5	35±6	34±8

Примечание: цифры в таблице обозначают процентное содержание популяции лимфоцитов.

ских/супрессорных лимфоцитов соответственно до $10 \pm 4\%$ и $34 \pm 8\%$ по сравнению с необработанными Лей-ОМе контрольными культурами МПКЧ ($P < 0,05$). Однако следует отметить, что при этом не было обнаружено уменьшения В-клеток и Г-лимфоцитов, с фенотипом CD4⁺. На фоне уменьшения количества натуральных киллеров и Т-лимфоцитов с фенотипом CD8⁻ увеличивалось процентное содержание В-клеток и Т-хелперов соответственно до $19 \pm 5\%$ и $35 \pm 6\%$. Полученные результаты свидетельствуют об ингибировании Лей-ОМе натуральных киллеров, цитотоксических/супрессорных лимфоцитов и согласуются с имеющимися в литературе сведениями по этому вопросу [5, 6, 20, 22].

Обработка Лей-ОМе лимфоциты человека были исследованы для иммунизации *in vitro* фикобилингом. Иммунизацию МПКЧ осуществляли двумя разными способами. По первому способу к МПКЧ добавляли специфический антиген (фикобилин), рекомбинантные лимфоциты (ИЛ-2 и γ -ИНФ) и кондиционированные среды Т-лимфоцитов человека, стимулированных МЛ. По второму способу, к МПКЧ добавляли тест-антиген. Лимфоциты, иммунизируемые вне организма по указанным способам, были применены в экспериментах по иммортализации клеток путем гибридизации соматических клеток в культуре. Результаты опытов по применению иммунизированных в культуре лимфоцитов для получения гетерогридом представлены в табл. 2. Как видно из этих данных, не только общее число растущих клонов в селективной среде, содержащей ГАТ+БЭ (эффективность гибридизации), но и количество клонов, синтезирующих антитела к использованному антигену (эффективность иммунизации), полностью зависят от наличия в среде культивирования рекомбинантных лимфоцитов (ИЛ-2 и γ -ИНФ) и кондиционированных сред Т-лимфоцитов человека. Эффективность гибридизации при получении гетерогридом с использованным лимфоцитом, иммунизированным в культуре по первому способу, примерно в 30 раз превышала эффективность гибридизации с применением МПКЧ, иммунизированных вне организма по второму способу. Гибридные клоны, полученные с использованием лимфоцитов, иммунизированных по второму способу, не синтезировали антитела к тест-антигену. В противоположность этому, из 36 гибридных клонов, полученных с применением МПКЧ, иммунизированных в культуре первым способом, 6 клонов являлись антителопродукентами. Способность 4 из указанных клонов синтезировать иммуноглобулины класса М свидетель-

ствуует о первичной антиген-специфической активации лимфоцитов человека в культуре.

Таблица 2. Влияние 2 способов иммунизации МПКЧ *in vitro* на эффективность гибридизации и содержание клонов-антителопродуцентов

Способ иммунизации МПКЧ	Общее число клонов	Эффективность гибридизации клеток, %	Число продуцирующих специфиче-ские антитела к физио-логиче-скому	Число клонов, продуцирующих антитела человека к иммуноглобулину	
				IgM	IgG
Первый способ	36	0,3	6	15	4
Второй способ	4	0,01	—	1	—

Таким образом, результаты экспериментов по получению гетерогбридом с применением в качестве одного из партнеров клеток мышиной плазмацитомы линии SPEBR-5, а в качестве другого партнера — иммунизированных различными способами человеческих лимфоцитов в культуре, свидетельствуют о том, что МПКЧ, обработанные Лей-ОМе, способны отвечать в клеточной культуре на тест-антиген лишь при наличии определенных условий, включающих присутствие в среде культивирования рекомбинантных лимфокинов и кондиционированных сред Т-лимфоцитов человека. Полученные данные подтверждают имеющиеся в литературе немногочисленные сведения о необходимости вышеуказанных условий для эффективной иммунизации *in vitro* и получения гибридных клонов-продуцентов антител [7—10]. Следует отметить, что наличие указанных условий вовсе не обязательно для эффективной иммунизации лимфоцитов человека *in vitro*, если используются такие сильные антигены, как эритроциты барана, гемоцианин, овальбумин, вирус гриппа и т. д. [9, 10, 16, 18]. Следовательно, успех в экспериментах по получению гибридом, продуцирующих человеческие моноклональные антитела, с использованием иммунизированных в культуре лимфоцитов, по нашему мнению, в решающей степени предопределяется параметрами используемых антигенов.

Известно, что продукция человеческих моноклональных антител гетерогбридомами весьма нестабильна и только многократное клонирование межвидовых гибридов может обеспечить стабильную продукцию этих антител длительно культивируемыми клетками [2, 3, 23]. В проведенных нами экспериментах все 6 полученных гибридомных клонов продолжали продуцировать антитела в течение 3 месяцев культивирования. В последующем было отмечено не только прекращение продукции специфических антител гибридными клетками, но и пролиферация этих культивируемых клеток.

С помощью РИИФ спустя 2 недели после прекращения продукции иммуноглобулинов человека гетерогбридомами исследовали наличие иммуноглобулинов на поверхности культивируемых клеток (иммуноглобулин-позитивных клеток). В табл. 3 представлены результаты изучения наличия иммуноглобулинов человека на поверхности гибридомных

Таблица 3. Процентное содержание клеток, несущих поверхностные иммуноглобулины человека, в популяциях гибридных и родительских клеток

Тестируемые клетки	Процент иммуноглобулин-позитивных клеток
Гибридные клоны	
3A11	0.1 ± 0.01
3A12	0.15 ± 0.02
5C6	0.13 ± 0.01
Нормальные лимфоциты человека	15 ± 1.5
Клетки мышиной плазмачитомы РЕВ-5	0.001

и родительских клеток. При проведении исследований использовали меченные ФИТЦ козыри антитела против иммуноглобулинов человека. Из приведенных в таблице данных следует, что в популяциях гибридных клонов содержалось примерно в 100 раз меньше иммуноглобулин-позитивных клеток по сравнению с нормальными лимфоцитами человека. Согласно имеющимся в литературе представлениям, процесс утраты специфических функций межвидовыми гибридами культивируемых клеток обусловлен сегрегацией хромосом [3, 23]. Следует полагать, что полученные нами данные о прекращении синтеза иммуноглобулинов человека гетерогрибридами после 3-х месяцев культивирования также, по-видимому, можно объяснить сегрегацией хромосом, содержащих гены, ответственные за синтез молекул иммуноглобулинов человека.

На основании вышеизложенных результатов можно сделать заключение о возможности получения гибридом, продуцирующих человеческие моноклональные антитела, с использованием в этих целях иммунизированных в культуре лимфоцитов человека. Конструирование новых типов гетеромиксом и гетерогрибром, характеризующихся генетической стабильностью и высоким уровнем продукции человеческих моноклональных антител, является целью наших дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березкина Е. В. Автореф. канд. дисс., 1990.
2. Кеннет Р. Г., Мил-Берк Э. Дж., Беллел К. В. Моноклональные антитела Гибридомы: новый уровень биологического анализа. М., 1983.
3. Рингерц И., Сэвидж Р. Гибридные клетки. М., 1979.
4. Paldwin R. W. Proc. Royal. Soc. Edinburgh-81B, 261-276, 1982.
5. Borrebaeck C. A. K., Danielsson L., Möller S. A. Biochem. Biophys. Res. Commun., 148, 3, 941-946, 1987.
6. Borrebaeck C. A. J. Immunol. Today 9, 11, 355-359, 1988.
7. Carroll K., Prosser E., O'Kennedy R. Hybridoma, 9, 1, 81-89, 1990.
8. Danielsson L., Möller S. A., Borrebaeck C. A. K. Immunol' 61, 51-55, 1987.
9. Hoffmann M. K. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 77, 2, 1139-1143, 1980.

10. Ho M.-K., Rand N., Murry L., Katz K., Rabin H. J. Immunol., 135, 6, 3831—3832, 1985.
11. Jhan S., Grunov R., Kiessing S. T., Bogacheva G. T., Arsenjeva E. L., Hlina A., Rochlin O. V., von Lohr R. Hybridoma, 6, 6, 679—687, 1987.
12. Jhan S., Grunov R., Porstmann T., Kiessing S. T., Steinbrenner H., Stelndl F., Matian-vich D., Purtiler D., Dreihardt E., Kattiger H., von Lohr R. J. Immunol. Meth., 106, 257—265, 1988.
13. Jhan S., Settmaier U., Haensel K., Kiessing S. T., Grunov R., von Baehr H. Hybridoma, 8, 5, 529—553, 1989.
14. Köhler G., Milstien C. Nature, 259, 495—497, 1975.
15. Köhler G., Roder J. C. Eur. J. Immunol., 11, 23—27, 1981.
16. Luzzati A. L., Giacomini C., Ramoni C., Frayton P. Biol. Inst. sieroter. Mil. 61, 1, 46—54, 1987.
17. Masuko Y., Sugano T., Matsumoto Y.-I., Sawada Sh., Katsuhiko T. Biochem. Biophys. Res. Commun. 135, 2, 495—500, 1987.
18. Michel D. H., Callard R. E. J. Immunol., 131, 3, 1229—1233, 1983.
19. Nakamura M., Burastero S. E., Nockins A. L., Cusall P. J. Immunol., 140, 4180—4186, 1988.
20. Ohlin H., Danielsson L., Carlson R., Borrebaeck C. A. K. Immunol., 66, 485—489, 1989.
21. Peltz G., Friedrich K., Anderson C. L., Petersen B. H. Mol. Immunol., 25, № 3, 243—250, 1988.
22. Thiele D. L., Lipsky P. E. J. Immunol., 136, 3, 1038—1048, 1986.
23. Thompson K. M. Immunol. Today, 9, 4, 113—117, 1988.
24. Voland J. R., Gorman D. H., Fan Q., Dalton R. W. Cell. Immunol., 110, 197—208, 1987.
25. Yamaguchi H., Kataoka K., Fortunato S. R., Livingston F. O., Lloyd C. O., Ottlinger H. F. Old L. J. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 86, 2116—2120, 1989.

Получено 25.XI 1991

Визит журн. Армения № 2.(44).1991

УДК 577.8

О ВОЗДЕЙСТВИИ БРОМИСТОВОГО ЭТИДИЯ И АДРИАМИЦИНА НА ПРОДУКЦИЮ АНТИТЕЛ КЛЕТКАМИ МЫШИНОЙ В-КЛЕТОЧНОЙ ГИБРИДОМЫ

М. Б. МЕЛИКСЕЯН*, Т. К. ДАВТЯН**, Е. В. БЕРЕЗКИНА***,
Т. Н. ИГНАТОВА***, Ю. Т. АЛЕКСАНИАН**

*Институт физиологии им. Л. А. Орбели АН Армении

**Институт эпидемиологии, вирусологии и мед. паразитологии
им. А. Б. Александряна МЗ Армении

***Институт цитологии АН СССР, Ленинград

Показано, что бромистый этидий и адриамицин стимулируют продукцию иммуноглобулинов мышинной В-клеточной гибридомой соответственно в 6 и 10,5 раза, причем эффект проявляется только при постоянном культивировании с ядами.

Նախց է արված, որ Վերդիումը քրոմիզը և ադրիամիցինը խթանում են իմունոգլոբուլինների արտադրությունը մկանյին բջջային իբրիդոմայի կողմից 6 և 10,5 անգամ, ընդ որում էֆեկտը դրսևորվում է միայն երբ նախապես կուլտիվացված ժամանակ:

Сокращения: ФСБ—фосфатно-цитратный буфер, К—клетка—кондиционированная культура, яд—ядо; МЛн АТ—микроклональные антигены.