

Занятие семинарского типа № 14

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Получение моноклональных антител

УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Общая характеристика моноклональных антител.

Антитела – белки сыворотки крови и других биологических жидкостей, которые синтезируются в ответ на введение антигена и обладают способностью специфически взаимодействовать с антигеном, вызывающим их образование, или с изолированной детерминантной группой этого антигена.

Разрешив ряд методических проблем, Милштейн, Говард, Батчер из Института физиологии (Кембридж) успешно осуществили слияние клеток, продуцирующих моноклональные антитела против крысиного антигена тканевой совместимости – молекулы, ответственной за генетическую индивидуальность организма и реакцию отторжения трансплантата.

Когда после слияния клеток двух различных линий образуется *клон*, антитела, которые он продуцирует, необязательно могут быть моноклональными в иммунологическом смысле, ибо в каждой клетке гибридного клона присутствуют хромосомы обеих родительских клеток, экспрессия которых ведет к продукции иммуноглобулинов селезеночных и миеломных клеток, но на ранних стадиях размножения гибридной клетки быстро утрачивается часть хромосом. Такая утрата хромосом имеет неслучайный характер. Исходя из этого Д. Келер и Ц. Милштейн пытались выделить клоны, которые потеряли хромосомы, принадлежащие миеломе, и поэтому экспрессировали хромосомы иммунных лимфоцитов, т.е. те которые, синтезируют только тяжелые и легкие цепи иммуноглобулинов (HL), реагирующих с эритроцитами барана. Такая селекция значительно бы облегчилась, если бы имелась мутантная миеломная линия, не продуцирующая иммуноглобулинов. Тогда в результате слияния получились бы только HL-гибридомы.

Отобранные клоны могут храниться в замороженном состоянии. В любое время определенную дозу такого клона можно ввести животному той же линии, от которой были получены клетки для слияния. У животного развивается опухоль, которая продуцирует моноклональные антитела заданной специфичности. Антитела обнаруживаются в сыворотке крови животного в очень высокой концентрации – 10 – 30 мг/мл. Клетки такого клона можно также выращивать *in vitro*, а секретируемые ими антитела выделять из культуральной жидкости.

Ц. Милштейн и его сотрудники получили моноклональные антитела, направленные против антигенов малого размера, т.е. гаптенов, белков, углеводов и гликолипидов, а также против вирусов и компонентов клеточной мембраны.

В настоящее время *гибридомная технология* получила широкое развитие. Теперь *моноклональные антитела* можно определить, как химический реагент известной структуры, который можно получить по желанию, тогда как соответствующая антисыворотка является вариабельной смесью реагентов и никогда не может быть в точности воспроизведена после гибели исходного животного. Моноклональные антитела очищают с помощью аффинной хроматографии на колонке с нужным антигеном и затем в течение 6 – 12 мес. получают неограниченное количество моноспецифических антител очень высокой степени чистоты и гомогенности. В то время как для получения антител традиционными методами необходимо приблизительно 1200 л сыворотки крови человека, полученной из крови 6000 доноров. Ц. Милштейн и его коллеги выделили «специфические антитела» для группы А из культур гибридомы, оказывавшиеся столь же эффективными, как и наилучшие из имеющихся реагентов.

Абсолютной воспроизводимостью, стандартностью и наивысшей из возможных специфичностью обладает моноклональные антитела, которые секретируются одним клоном антителообразующих клеток и идентичны не только по антигенной специфичности, но и по классу и типу тяжелых и легких цепей в молекуле. Разделить клоны антителообразующих клеток, образующихся *in vivo*, невозможно, поэтому моноклональные антитела получают с использованием гибридной технологии *in vitro*. Продуцентом является *гибридная клетка (гибридома)* – продукт слияния В-лимфоцита, секретирующего антитела на определенный антиген и непрерывно растущей клетки миеломы.

До недавнего времени для гибридизации использовали исключительно миеломные клетки и В-лимфоциты мышей или крыс, но продуцируемые ими моноклональные антитела имеют ограниченное терапевтическое применения, т.к. они представляют собой чужеродный белок для человеческого организма.

Освоение технологии получения гибридом на основе иммунных клеток человека связано со значительными трудностями: человеческие гибридомы растут медленно, сравнительно малостабильны, но уже получены гибридомы человека – продуценты моноклональных антител. Оказалось, что и человеческие моноклональные антитела в некоторых случаях вызывают иммунные реакции, и их клиническая эффективность зависит от правильного подбора класса антител, гибридомных линий, подходящих для данного больного.

К достоинствам человеческих моноклональных антител относится способность распознавать тонкие различия в структуре антигена, которые не распознаются моноклональные антитела мыши и крысы.

Предприняты попытки получения *химерных гибридом*, сочетающих мышинные миеломные клетки и человеческие В-лимфоциты; такие гибридомы находят пока лишь ограниченное практическое применение.

Наряду с преимуществами моноклональные антитела имеют *недостатки*, порождающие проблемы их практического использования. Они не стабильны при хранении в высушенном состоянии, в то время как в смеси обычных (поликлональных) антител всегда присутствует группа антител, устойчивая при избранных условиях хранения. Таким образом, неоднородность обычных антител дает им дополнительный резерв стабильности при изменении внешних условий, что соответствует одному из основных принципов повышения надежности систем. Моноклональные антитела нередко имеют слишком низкое сродство к антигену и чрезмерно низкую специфичность, что препятствует их применению против изменчивых антигенов, характерных для инфекционных агентов и опухолевых клеток. Необходимо также отметить высокую стоимость моноклональных антител на международном рынке.

2. Гибридная технология.

Было предпринято множество попыток отыскать способы получения антител с узкой специфичностью. Так, при определенных условиях иммунизации бактериальными полисахаридами удается получить высокоиммуногенный препарат антител с узкой специфичностью, но большинство попыток оказались безуспешными. Высокоспецифические антитела были получены, когда антителообразующие клетки перенесли в организм летально облученных животных и из селезенки извлекали локальные зоны, содержащие очаги пролиферации одного клона иммунных лимфоцитов. Эти клоны продуцировали в сущности моноклональные антитела, но их можно было выделить в очень незначительных количествах. Данные опыты имели лишь теоретическое значение для оценки числа клонов и не давали препаративного способа получения моноклональных антител.

В 1975 г. Д. Келер и Ц. Милштейн предложили принципиально иной метод получения гомогенных антител. Они осуществляли слияние плазматомы с клетками

селезенки иммунизированного животного, получив, таким образом, гибридомы, которые унаследовали от опухолевых клеток способность неограниченно размножаться, а от клеток селезенки – синтезировать антитела предопределенной специфичности. Этот метод очень быстро получил широкое распространение во всем мире (Д. Келер и Ц. Милштейн в 1984 г. получили Нобелевскую премию).

Предпосылками для создания гибридомной технологии были ранее разработанные методы:

- 1) получение миелом и адаптация их культивирования вне организма;
- 2) соматическая гибридизация;
- 3) получение селективных культуральных сред.

Получение миелом

У мышей получить миеломы довольно легко. Опухоли индуцируют у животных путем внутрибрюшинного введения минеральных масел или инертного твердого пластика. Для возникновения миелом большое значение имеет генетический статус животного.

Но миеломная система как источник антител к большинству антигенов не оправдала надежды исследователей, т.к. не удавалось иммунизировать животных, а затем получить мышинные миеломы, продуцирующие антитела к иммунизирующему антигену. Таким образом, миеломные белки оказались с неизвестной антигенной специфичностью и в дальнейшем были использованы как источник поддержания неограниченной пролиферации.

Соматическая гибридизация (слияние соматических клеток)

Разработка техники гибридизации соматических клеток широко проводилась после открытия феномена *спонтанной гибридизации*. При слиянии плазматических мембран клеток образуются клетки с двумя или большим числом ядер – *гетерокарионы*. После первого деления ядра сливаются и образуются одно ядро с набором хромосом от всех слившихся партнеров, т.е. образуется гибридная клетка.

Первоначально метод гибридизации соматических клеток использовали для изучения механизма регуляции дифференцированных функций, а также для соматических и генетических подходов к картированию генов.

Низкую частоту образования гибридов можно было увеличить, используя ряд агентов, вызывающих слияние: вирус Сендай, мезолицитин, полиэтиленгликоль (ПЭГ). Механизмы слияния в значительной степени остаются до конца неизученными. Предполагают, что полиэтиленгликоль уменьшает заряд клеточной поверхности и сорбирует на себе воду, облегчая тем самым взаимный контакт плазматических мембран соседних клеток.

Получение селективных культуральных сред (селекция гибридных клеток)

Частота образующихся гибридов, даже при использовании агентов, повышающих слияние, крайне низка. Для их выделения необходимы *селективные среды*, позволяющие расти преимущественно образовавшимся гибридам. В настоящее время разработано несколько методов селекции гибридных клеток. Одним из наиболее распространенных является метод, основанный на применении системы: *гипоксантин, аминоптерин и тимидин (ГАТ)*.

В системе ГАТ используется антагонист фолиевой кислоты – *аминоптерин*. Тетрагидрофолиевая кислота является коферментом, необходимым для превращения 5-аминоимидазол-4-карбоксамида (АИКР) в рибонуклеотид формиамидоимидазол-4-карбоксамида (ФАИКР) в биосинтезе пуринов и в биосинтезе пиримидинов. Аминоптерин предотвращает образование тетрагидрофолята, ингибируя гидрофолатредуктазу, и таким образом, блокирует процессы биосинтеза, как пуринов, так и пиримидинов. В клетках существуют обходные пути биосинтеза нуклеотидов, в которых происходит реутилизация

гипоксантина и тимидина. Эти пути зависят от двух ферментов: *тимидинкиназы* (ТК), катализирующей превращение тимидина в дезокситимидинтрифосфат, и *гипоксантингауанинфосфорибозилтрансферазы* (ГГФРТ), катализирующей трансформацию гипоксантина в инозинмонофосфат и гуанина в гуанозинмонофосфат. При добавлении в среду *гипоксантина* и *тимидина* клетки могут нормально синтезировать ДНК в условиях, когда основной путь биосинтеза блокирован аминоптерином. Если клетка имеет дефект по этим ферментам, то в присутствии аминоптерина она погибает, но способна к выживанию, если ее слить с другой клеткой, у которой эти ферменты есть. *Двойной*, или *полной селективной*, *системой* является такая система, когда происходит слияние двух клеток, в одной из которых отсутствует ТК, в другой – ГГФРТ. В гибридах идет взаимная комплементация этих ферментов, и они выживают в среде ГАТ, тогда как родительские клетки погибают.

Для получения и отбора мутантных клеток, не имеющих ТК и ГГФРТ, используют токсические аналоги пуринов и пиримидинов, добавляемые одновременно с мутагенными агентами. Эти аналоги включаются в ДНК с помощью указанных ферментов. В присутствии токсических аналогов выживают только те клетки, где нет фермента, способного к включению этого аналога в ДНК. Так, в присутствии 8-азагуанина или 6-тиогуанина выживают только клетки без фермента ГГФРТ, а в присутствии 5-бромдезоксипуридина – клетки без фермента ТК.

Селекция гибридов основана на том, что в среде ГАТ родительские миеломные клетки погибают, а клетки селезенки не обладают способностью расти при данных условиях культивирования, поэтому выживают и размножаются только гибридные клетки, унаследовавшие способность размножаться и синтезировать специфические иммуноглобулины. Но в гибридах синтезировались не только антитела клеток иммунной селезенки, но и иммуноглобулины родительской миеломы, а также гибридные молекулы, состоящие из полипептидных цепей, как миелом, так и селезенки. Данная проблема будет преодолена путем использования миеломных клеток, в которых отсутствовала экспрессия собственных цепей иммуноглобулинов.

3. Этапы получения гибридом, синтезирующих моноклональные антитела.

1. Селекция миеломных клеток.

Для получения гибридом: В-лимфоциты и миеломные клетки выделяют из мышей и крыс. *Клетки миеломы (плазмоцитомы)* – это злокачественные трансформированные лимфоидные клетки костного мозга, представляющие собой клоны, образованные при делении единичных измененных опухолевых В-клеток, каждая из которых синтезирует моноклональные антитела неизвестной специфичности и обладает способностью к неограниченному размножению *in vivo* и *in vitro*.

На практике чрезвычайно сложно получить миелому с заданной антигенной специфичностью, поэтому получают гибридные клетки-продуценты моноклональных антител, наследующие от миеломного партнера только способность к неограниченному размножению.

Клетки плазмоцитомы, используемые для гибридизации, получают путем мутагенеза. Они должны иметь такие селективные маркерные признаки как устойчивость к 8-азогуанину и бромдезоксипуридину – токсичным аналогам азотистых оснований, входящих в состав ДНК. Такая устойчивость обусловлена неспособностью клетки синтезировать ферменты гипоксантингауанинфосфорибозилтрансферазу (ГГФРТ) и тимидинкиназу (ТК), которые участвуют в процессах включения пуринов и пиримидинов в синтез нуклеиновых кислот по резервному пути биосинтеза в клетках млекопитающих. ГГФРТ участвует в синтезе пуринов, а ТК – пиримидинов при наличии соответствующих предшественников (гипоксантина и тимидина).

Выделение мутантов, неспособных к синтезу ферментов, осуществляется воздействием мутагенов на клетки миеломной линии с последующим культивированием

их в среде, содержащей 8-азогуанин и бромдезоксипуридин. На среде с 8-азогуанином выживают клетки, дефектные по ГГФРТ, а на среде с бромдезоксипуридином – по ТК.

При выборе миеломной линии необходимо учитывать, что в процессе культивирования клеточные линии могут терять способность к слиянию в результате перерастания, потери устойчивости к аминоптерину или заражения микоплазмой. Поэтому успех гибридизации во многом будет определяться тем, в каком состоянии находится миеломная линия, которую выбрали для слияния.

Принципы культивирования миеломных линий:

1. Миеломная линия, предварительно проверенная на способность к слиянию, должна быть размножена и заморожена в достаточном количестве;
2. После разморозки клетки можно вести в культуре не более одного месяца;
3. Для слияния берут миеломные клетки в логарифмической фазе роста, для этого в культуру через день добавляют свежую среду; до момента слияния клетки должны находиться в этой фазе, по крайней мере, одну неделю;
4. Концентрация клеток в культуре не должна превышать 0,5 – 1,0 млн./мл;
5. Культуру клеток необходимо ввести в культуральную среду, к которой она адаптирована; перевод культуры в другую среду проводят постепенно;
6. Периодически целесообразно культивировать миелому в присутствии токсического аналога нуклеотидов, использованного для селекции данной линии, чтобы избежать перерастания ревертантов;
7. Если миеломная линия потеряла способность к слиянию, размораживают новые ампулы, хранящиеся в жидком азоте.

2. Иммунизация мышей антигеном.

Схемы иммунизации, применяемые разными исследователями, значительно варьируются и определяются имеющимся типом и количеством антигена. Иммунизация должна стимулировать формирование иммунного ответа и выраженное антителообразование.

Антиген вводят внутривенно, внутрибрюшно или подкожно с адьювантом (веществом, усиливающим иммуногенность антигенов) или без него в нарастающей дозе.

При иммунизации животных иммунный ответ вырабатывается на все антигенные детерминанты всех компонентов вводимого материала. Это осложняет отбор клонов, синтезирующих нужные антитела. Поэтому по возможности для иммунизации применяют очищенные антигены, по крайней мере, на ее последних этапах. Однако одним из основных достоинств гибридной технологии является именно то обстоятельство, что специфические антитела против данного антигена можно получить, взяв для иммунизации неочищенный препарат антигена, и затем использовать эти антитела для его очистки.

Назначение процесса иммунизации состоит в том, чтобы увеличить долю клеток, продуцирующих антитела заданной специфичности и перевести эти клетки в функциональное состояние, при котором они способны сливаться образовывать антителопродуцирующие гибридные клетки. Экспериментально установлено, что для гибридизации необходимо выделить селезеночные лимфоциты животных через 3 – 4 суток после последней иммунизации, т.е. когда в лимфоидных органах много активно пролиферирующих клеток.

Способы и схемы иммунизации

Существует большое число способов и схем иммунизации. Схемы иммунизации зависят от природы антигена и его иммуногенности. Антигены клеточной поверхности являются сильными иммуногенами, тогда как большинство растворимых белков – слабые иммуногены. В последнем случае необходимо применять различные адьюванты, усиливающие иммунный ответ животного. Среди адьювантов широкое распространение

получил полный адьювант Фрейда (ПАФ). Помимо этого используют введение антигена, преципитированного на квасцах вместе с антигеном убитых клеток *Bordetella pertussis*. Обычно антиген вводят неоднократно, что необходимо для развития иммунного ответа. Вместе с тем гипериммунизация может снизить способность образовывать гибридомы. Хотя иногда бывает достаточно одной иммунизации.

Для большинства растворимых антигенов можно использовать следующую *схему иммунизации*:

1. Вводят 1 – 100 мкг антигена в ПАФ (внутрибрюшинно) или без ПАФ (подкожно).
2. Через 2 – 3 недели вводят антиген в физиологическом растворе внутрибрюшинно или внутривенно. Эту процедуру повторяют до появления высокого титра антител. (*Титр антител* – величина, обратная разведению сыворотки, при которой степень иммунологической реакции снижается в два раза по сравнению с максимальной величиной).

3. Последнюю иммунизацию делают внутривенно. Через 3 дня животных забивают, извлекают селезенку и готовят суспензию селезеночных лимфоцитов для гибридизации.

Когда в распоряжении экспериментатора имеется небольшое количество антигена или необходимо провести ускоренную гибридизацию, используют *метод однократной иммунизации внутрь селезенки* или *метод иммунизации in vitro*.

При однократной иммунизации внутрь селезенки используется всего 20 мкг белка или 1 млн. клеток. Этот метод рекомендуется, когда нужно быстро получить гибридомы, имея в распоряжении минимальное количество антигена.

Иммунизация in vitro имеет ряд существенных преимуществ:

- а) период иммунизации занимает 4 – 5 сут;
- б) требуется небольшое количество антигена;
- в) повышается процент встречающихся клеток;
- г) легко подбирать факторы, влияющие на эффективность иммунизации.

3. *Получение клеток селезенки (получение В-лимфоцитов).*

В гуморальном иммунитете участвует преимущественно лимфоидная ткань селезенки, обеспечивая накопление большого количества плазматических клеток, синтезирующих антитела. Через 4 дня после последней инъекции антигена мышей убивают, извлекают селезенку, измельчают ее и готовят суспензию в специальной среде для культивирования, в состав которой входят аминокислоты, витамины, углеводы и неорганические соли. Эту взвесь используют для слияния. Суспензию клеток селезенки готовят при комнатной температуре.

4. *Гибридизация (слияние) клеток миеломы и В-лимфоцитов селезенки.*

Для проведения слияния используют полиэтиленгликоль (ПЭГ), который вызывает перераспределение мембранных белков, обеспечивая контакт и слияние клеток. В ПЭГ должны присутствовать ионы кальция, которые способствуют сближению клеток и образованию между ними кальциевых каналов.

Лимфоциты селезенки и клетки миеломы смешивают, осаждают центрифугированием, готовят суспензию в среде для слияния, содержащей 50 %-ный раствор ПЭГ и хлорид кальция, выдерживают 30 – 40 мин при 37 °С, а затем опять центрифугируют. Слияние проводят либо в осадке в конической пробирке, либо в монослое.

Этапы гибридизации клеток миеломы и В-лимфоцитов селезенки:

1. Готовят суспензию селезеночных лимфоцитов и миеломы отмывают 2 раза в среде без сыворотки с помощью метода центрифугирования.

2. Смешивают две суспензии в одной пробирке в соотношении от 1: 1 до 1: 10 в зависимости от выбора экспериментатора.

3. Клетки помещают в центрифужную пробирку на 50 мл и центрифугируют при комнатной температуре 3 – 5 мин при 800 – 1000 об/мин.

4. Тщательно удаляют всю надосадочную жидкость и медленно, по каплям, в течение 1 мин добавляют раствор полиэтиленгликоля, осторожно перемешивая осадок кончиком пипетки.

5. По истечении одной минуты очень медленно и постепенно добавляют теплую (37 °С) среду без сыворотки, доводя объем до 50 мл.

6. Ставят пробирку в CO₂-инкубатор на 1 – 2 ч.

7. Центрифугируют 5 мин при 1000 об/мин.

8. Осадок осторожно ресуспендируют в среде культивирования в необходимом объеме.

9. Разливают суспензию слившихся клеток по 0,1 мл в 96-ти луночные планшеты и помещают в CO₂-инкубатор.

10. Постепенно заменяют среду культивирования селективной средой, добавляя по 0,1 мл среды ГАТ через каждые 3 дня.

11. Начиная с пятых суток, ежедневно просматривают планшеты под микроскопом и отмечают в них рост колоний гибридных клеток, записывая номера положительных лунок.

12. Культуры подкармливают каждые 2 – 3 сут., удаляя половину культуральной жидкости, добавляя такое же количество свежей среды.

13. Через 7 – 14 дней из лунок с растущими гибридами отбирают супернатан и тестируют его на наличие специфических антител подходящим методом скрининга.

14. Клетки гибридом, синтезирующих специфические антитела, переносят в 24-х луночные планшеты, размножают, замораживают и клонируют как запасную культуру. Оставшиеся в 96-ти луночной планшете клетки продолжают еще некоторое время культивировать.

5. Селекция гибридом на среде ГАТ.

Осадок клеток ресуспендируют в среде ГАТ, содержащей гипоксантин (Г), аминоптерин (А), тимидин (Т), разливают в лунки микропланшет и инкубируют при 37 °С в атмосфере диоксида углерода в течение 10 – 16 дней. Через каждые 3 – 4 дня производят замену в лунках на новую среду того же состава.

В среде ГАТ происходит отделение неслившихся миеломных клеток и лимфоцитов от гибридом, выживают на такой среде только гибридные клетки.

Аминоптерин (4-аминофолиевая кислота) блокирует основной путь биосинтеза нуклеотидов для всех клеток. Этот препарат обладает сильным цитостатическими свойствами, как аналог фолиевой кислоты он блокирует синтез пуринов, тимина и других аминокислот при этом происходит повреждение клеток, особенно быстрорастущих.

Гипоксантин и *тимидин* добавляют в среду в качестве предшественников пуринов и пиримидинов, использующихся для синтеза нуклеотидов по резервному пути биосинтеза с участием ТК и ГГФРТ.

Миеломные клетки погибают на среде ГАТ, т.к. из-за дефектности по ТК и ГГФРТ не способны использовать гипоксантин и тимидин для синтеза нуклеотидов.

Неслившиеся лимфоциты отмирают через несколько дней после гибридизации, т.к. они не способны к длительному выживанию *in vitro*.

Таким образом, на среде ГАТ должны выживать только непрерывно растущие клоны гибридных клеток. В гибридомах будут экспрессированы гены миеломных клеток и В-лимфоцитов. От миеломных партнеров наследуются способность к неограниченному росту в культуре или *in vivo*, а от В-лимфоцитов селезенки – способность к продукции антител известной специфичности и возможность использовать обходной путь синтеза нуклеотидов при участии ТК и ГГФРТ.

Быстро растущие клоны гибридом становятся различимы в виде плотных колоний клеток на дне лунок микропланшет. Подсчет количества клонов в лунках осуществляется с помощью инвертированного микроскопа.

6. Определение антителиобразующей способности гибридом.

Идентификация клеток, синтезирующих антитела заданной специфичности очень важная процедура во всей гибридомной технологии. Новообразованные гибридомы могут быть нестабильными в отношении синтеза антител, поэтому методы раннего выявления отдельных антителиобразующих клонов должны быть быстрыми и простыми. Наличие антител определяется в надосадочных фракциях культуральной среды в лунках микропланшет, для чего отбирают по 50 мкл среды с помощью автоматических многоканальных пипеток. Концентрацию антител определяют высокочувствительными методами радиоиммуноанализа (РИА) или иммуноферментного анализа (ИФА).

7. Клонирование гибридом.

Обнаруженные антителиобразующие клоны должны быть немедленно реклонированы, необходимость этого обусловлена тем, что после слияния во многих гибридах начинается «выброс» хромосом, продолжающийся до тех пор, пока число хромосом в клетке не будет равным приблизительно $2N$. В ходе этого процесса некоторые клетки могут потерять хромосомы, несущие гены иммуноглобулинов. Существует опасность, что такие клетки, не способные больше продуцировать иммуноглобулины, будут расти лучше клонов антителиобразующих клеток. В каждой лунке не всегда образуется только один гибридный клон. В этом случае возникает необходимость отделить ненужные клоны от тех, которые представляют интерес для исследования.

Гибридомы можно клонировать *методом предельных разведений*. Клетки отбирают из тех лунок, в которых обнаружены антитела нужной специфичности, ресуспендируют в синтетической среде обычного состава с добавлением сыворотки крови плода коровы и затем разводят этой же средой таким образом, чтобы при последующем разливе в каждую лунку микропланшета попала бы только одна клетка и формировался только один клон гибридом.

Для выращивания гибридных клонов часто применяют *кондиционированные питательные среды*, в которых уже культивировались макрофаги или лимфоциты, и которые выполняют в этом случае роль фидеров (клеток-кормушек). Применяют также *совместное культивирование гибридом и фидерных клеток*, получаемых от нормальной мыши соответствующей линии.

Через несколько дней проверяют наличие антител только в тех лунках, в которых обнаружен лишь один клон. В том случае, если в лунках образуется больше одного клона, клонирование повторяется. На этом этапе также проводят контроль антителиобразующей способности клонов.

Рассмотрим подробнее некоторые методики клонирования гибридом.

Клонирование методом предельных (лимитирующих) разведений.

1. За один или два дня до клонирования засевают фидерные клетки в 96-ти луночные планшеты.
2. Отбирают клетки гибридом и подсчитывают их количество в камере Горяева.
3. Делают десятикратное разведение в культуральной среде до концентрации в последней пробирке – 10 клеток в мл.
4. Из последней пробирки отбирают по 0,1 мл суспензии клеток и рассеивают в 96 лунок планшета.
5. Через 5 – 7 дней под инвертированным микроскопом отмеривают лунки с растущими клонами.

Клонирование в полужидком агаре.

1. В чашку Петри на культуральной среде засевают фидерные клетки.
2. Культуральную среду удаляют, заливают нижний (твердый) слой, содержащий 0,5 % агар-агара в среде культивирования, и дают ему затвердеть.
3. Добавляют второй слой (мягкий), содержащий 0,3 % агар-агара, в который включаются клонируемые клетки. Для приготовления мягкого агарового слоя смешивают равные части среды культивирования двойной концентрации и 0,6 % агар-агара (в дистиллированной воде), помещают в водяную баню при 43 – 44 °С до употребления. Клетки в минимальном объеме вносят в мягкий агаровый слой и держат при комнатной температуре до затвердения.
4. Чашки помещают в CO₂-инкубатор и наблюдают за ростом колоний. Колонии становятся видимыми через 7 – 14 сут.
5. Выросшие колонии извлекают пипеткой и переносят в жидкую культуральную среду для дальнейшего размножения.

Клонирование с помощью проточного цитофлуориметра.

Д. Паркс с сотрудниками (1971 г.) предложили модификацию проточного цитофлуориметра, позволяющего клонировать индивидуальные клетки. Для этого готовят флуоресцентные микрошарики из латекса и покрывают их антигеном. Такие шарики адсорбируются на антигенспецифичных гибридных клетках, что позволяет выделить их на этом приборе.

После выделения тем или иным способом положительных клонов их клетки размножают в достаточном количестве и образцы замораживают. Периодически необходимо проводить их реклонирование.

8. Накопление клеток, синтезирующих моноклональные антитела.

Когда количество гибридных клеток в лунках заметно увеличится, их переносят в планшеты с лунками больших объемов и затем в культуральные сосуды объемом 25 – 50 мл. На этом этапе можно получить достаточное количество для культивирования *in vivo* или в специальных биореакторах *in vitro*.

Гибридомы легко культивируются после их хранения в замороженном состоянии в жидком азоте при – 70 °С в среде, содержащей 20 % сыворотки крови и 10 % диметилсульфоксида. Клетки замораживают: на этапах получения, клонирования и реклонирования для последующего возобновления в случае ее гибели вследствие контаминации.

Замораживание гибридных клеток.

Готовят среду для замораживания, состоящую из среды культивирования с добавками 20 % эмбриональной телячьей сыворотки и 10 % диметилсульфоксида.

1. Клетки осаждают центрифугированием при 20 об/мин, 4 °С.
2. К осадку добавляют необходимое количество холодной среды и разливают по ампулам для замораживания в концентрации 2 – 5*10⁶ мл.
3. Замораживание можно производить несколькими способами:
 - в специальном аппарате с программным обеспечением постепенного снижения температуры до – 120 °С;
 - помещают ампулы в коробку из пенопласта с толщиной стенок около 1 см; коробку закрывают крышкой и ставят на сутки в морозильник (при – 70 °С), после чего ампулы переносят в контейнеры с жидким азотом.

При отсутствии в лаборатории резервуара с жидким азотом замороженные клетки можно хранить при – 70 °С в течение года. В жидком азоте клетки хранят несколько лет.

Размораживание клеток.

1. Ампулы с замороженными клетками вынимают из сосуда с жидким азотом и быстро помещают на водяную баню при 37 °С.

2. Растаявшую суспензию клеток переносят в центрифужные пробирки и добавляют не менее 10 мл культуральной среды так, чтобы содержание диметилсульфоксида в ней снизилось до 1 %.

3. После центрифугирования к осадку добавляют нужное количество культуральной среды и выращивают гибридные клетки в 96- или 24-луночных планшетах.

Существует также более мягкий способ разморозки гибридом.

1. Готовят 10 мл теплой среды для культивирования.

2. Ампулу с клетками помещают в водяную баню при 37 °С.

3. К размороженным клеткам добавляют 1 мл среды, встряхивают и оставляют на 4 мин.

4. Постепенно добавляют 2, 4 и затем еще раз 4 мл среды, доведя объем среды до 10 мл.

5. Клетки помещают во флаконы и культивируют в течение ночи при 37 °С.

6. Сливают мертвые клетки и добавляют свежую среду.

9. Крупномасштабное культивирование гибридом и накопление моноклональных антител.

При росте гибридом в культуральной жидкости достигается выход 10 – 100 мкг/мл чистых антител. Такие антитела можно использовать без дополнительной очистки (после концентрирования) в основном они используются в качестве первых антител для непрямой флуоресценции или иммунопреципитации.

Если требуются большие количества антител, то гибридому можно выращивать в виде трансплантируемой опухоли у мышей гистосовместимой линии.

Культивирование гибридом in vivo

Для культивирования гибридом *in vivo* их вводят мышам или крысам внутрибрюшинно. Моноклональные антитела будут накапливаться во внутрибрюшинной асцитической жидкости в количестве 1 – 25 мг/мл. Для получения асцитов перед введением гибридных клеток (в период от трех дней до одного месяца) внутрибрюшинно инъецируют 0,5 мл пристана (2, 6, 10, 14-тетраметилпентадекан) или неполный адьювант Фрейнда, которые повышают способность гибридом расти в брюшной полости. Асцитную жидкость можно собирать с 14-го дня после введения пристана или адьюванта.

Процесс культивирования гибридом *in vivo* является очень дорогим методом, т.к. животных необходимо содержать в специальных вивариях, к которым предъявляются очень строгие санитарно-гигиенические требования: в них должны быть обеспечены асептические условия, осуществляться подача стерильного воздуха, стерильной пищи, обязательным условием является наличие специальной одежды для персонала, работающего по вахтовому методу, следовательно, создание таких условий связано с большими трудностями из-за необходимости содержания большого количества животных. Ведь для производства 1 кг моноклональных антител необходимо несколько тысяч мышей или крыс.

Размножение гибридом in vitro

Предпочтительнее культивировать гибридомы в специальных биореакторах большого объема, где можно достичь значительно большего выхода моноклональных антител, чем от животных. При крупномасштабном культивировании стоимость моноклональных антител значительно снижается.

При росте в культуре гибридные клетки должны поддерживаться в логарифмической фазе роста в концентрации не выше 0,5 млн./мл. Клетки наращивают в культуральных

флаконах увеличивающихся размеров. Ускорению роста гибридом может способствовать добавление фидерных клеток. Клетки можно культивировать как в стационарной культуре, так и в роллерной, а также в различного рода культиваторах (ферментерах). При обычных методах культивирования в супернатанах культур содержится 10 – 100 мкг/мл антител. Более высокие концентрации удается получить в ферментерах на специальных питательных средах с низким содержанием эмбриональной телячьей сыворотки и добавлением определенных препаратов (до 660 мкг/мл).

В настоящее время созданы специальные системы интенсивного культивирования гибридом в течение 1 – 2 мес. По истечении этого срока необходимо проводить повторное клонирование гибридом, поскольку могут возникать клетки, не продуцирующие антитела.

Способы крупномасштабного культивирования гибридом и получения моноклональных антител:

1. *Инкубирование в аппаратах эрлифтного типа.* Суспензия клеток-антителопродуцентов постоянно перемешивается путем подачи газов: смеси диоксида углерода и воздуха, но в таких условиях возможно разрушение значительного количества клеток, поэтому для устранения данного нежелательного явления их заключают в микрокапсулы.

2. *Совмещение эрлифтного типа культивирования с одновременным микрокапсулированием* (в данном случае цикл культивирования составляет 1 мес., а выход антител – 59 – 250 мг/мл). Существуют следующие разновидности данного метода культивирования:

а) иммобилизация гибридом на стеклянном матриксе или в капсулах агарозы.

б) создание системы с инкапсулированными клетками-продуцентами моноклональных антител. Микрокапсулы из альгината поли-L-лизина проницаемы для метаболитов, но не для молекул антител. Через две недели культивирования капсулы отделяются от культуральной жидкости и размыкаются. Используют также микрокапсулы, состоящие из альгината, стабилизированного кальцием.

3. *Создание мембранноперфузионных систем.* Гибридомы помещают в пространства полых волокон, через которые проходит питательная среда. При таком способе культивирования гибридомы достаточно стабильны, а выход моноклональных антител достигается такой же, как при использовании капсул из альгината.

Для улучшения очистки и увеличения выхода моноклональных антител постоянно совершенствуется состав сред для культивирования, например, уменьшают содержание в среде сыворотки крови крупного рогатого скота или эмбриональной телячьей сыворотки, заменяя их комплексом низкомолекулярных биологически активных веществ и гормонов.

10. Концентрирование и очистка моноклональных антител

Супернатаны культур можно использовать и без предварительной очистки в иммуноферментных и иммуногистохимических анализах.

Если моноклональные антитела, содержащиеся в асцитической жидкости, необходимо получить в чистом виде, то сначала определяют их класс и подкласс. Для идентификации класса антител применяют набор антител, специфических к отдельным классам и подклассам мышинных иммуноглобулинов, которые выпускаются многими фирмами.

Грубую иммуноглобулиновую фракцию получают высаливанием белков сульфатом аммония (45 % насыщения) с последующим диализом. Затем можно использовать различные методы аффинной или ионообменной хроматографии. Хроматографией на сефарозе с ковалентно пришитым белком А, обладающим высоким сродством к Fc-фрагменту антител, можно очистить иммуноглобулины мыши (IgG2a, IgG2b, IgG3).

По окончании процесса сорбции, иммуноглобулины десорбируют и концентрируют с применением лиофильной сушки

4. Области применения моноклональных антител.

1. Диагностика:

- иммунологические анализы биологических жидкостей и клеток организма, микроорганизмов, вирусов и т.п.;
- иммуногистохимические методы анализа;
- иммуносцинография опухолей;
- типирование групп крови и тканей;

2. Терапия:

- воздействие на отдельные клеточные популяции;
- влияние на иммунные регуляторные механизмы с помощью антител к лимфокинам;
- иммунорегуляция с помощью антиидиотипических антител;
- направленный транспорт лекарственных веществ;
- элиминация токсинов, иммунотоксинов и аллергенспецифичных антител.

3. Технология:

- идентификация молекул;
- очистка молекул и клеток, несущих специфический антиген;

4. Научные разработки:

- исследования этиологии и патогенеза различных заболеваний;
- исследование системных и межсистемных механизмов регуляции;
- создание новых лекарственных средств и биопрепаратов.

Рассмотрим некоторые примеры практического использования моноклональных антител:

Поскольку гибридомы можно хранить в замороженном состоянии, в некоторых институтах и лабораториях для научных целей создаются так называемые гибридомные банки.

Многие фармацевтические фирмы кровно заинтересованы в увеличении масштабов производства моноклональных антител, поскольку сфера их применения помимо количественного определения различных веществ включает разнообразную диагностику (например, идентификация определенного гормона, вирусных или бактериальных антигенов, антигенов группы крови и тканевых антигенов).

Благодаря использованию моноклональных антител стало возможным определение дозы лекарственных средств. Надежность и экономичность такой иммунодозировки следует считать существенным достижением. В мае 1981 г. Управление по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств США впервые утвердило к продаже набор для диагностического скрининга на основе гибридом, предназначенный для установления аллергена. Такие же наборы разрабатываются для тестирования гормонов, диагностики вирусных заболеваний, обнаружения некоторых видов рака и т.п.

Еще одним направлением применения моноклональных антител является устранение неблагоприятных последствий, вызванных передозировкой лекарственными средствами. Антитела против лекарственных препаратов, например, дигоксина, могут оказаться полезными для снятия неблагоприятных последствий, вызванных его передозировкой, хотя сегодня до конца и не ясно, нужно ли применять их экстракорпорально, связанными с твердым носителем, через который циркулирует кровь, или вводить непосредственно в кровотоки.

Диагностика злокачественных новообразований и наблюдение за ними:

На сегодняшний день известно несколько специфических опухолевых маркеров, которые используются в диагностике, прогнозировании и выявлении распространения опухолей.

Некоторые из них обнаруживаются в крови, а другие находят в препаратах опухолей. Так, например, *L-фетопротейн* является главным белком сыворотки плода: его содержание уменьшается в течение первого года жизни. Таким образом, определяя содержание L-фетопротейна в плазме при помощи метода РИА (радиоиммунологического анализа), было обнаружено, что оно повышается у многих больных гипатомой, а также при раке семенников.

У многих больных, страдающих раком прямой кишки, в плазме отмечается повышенное содержание *карциноэмбрионального антигена*. Дальнейшее его увеличение может служить указанием на неэффективность химио- и лучевой терапии.

Помимо того, что моноклональные тела применяются, как специфические реагенты в стандартных тестах, они могут использоваться и для идентификации новых, более специфических маркеров опухолей.

Так, например, Ритсу и его сотрудникам удалось получить моноклональные антитела к антигену клеток при остром лимфолейкозе человека.

Развитию новых способов лечения может способствовать направленное введение лекарственных препаратов, присоединяемых к антителам против других опухолей.

Направленное введение лекарственных препаратов.

Моноклональные антитела могут найти применение для введения лекарственных веществ и токсинов в определенную часть тела (например, в опухоль): либо путем их непосредственного присоединения к таким веществам, либо путем связывания с поверхностью липосом, содержащих внутри эти вещества.

Были получены комплексы антител к поверхностным антигенам раковых клеток со многими неспецифическими противораковыми средствами, но далеко не всегда они оказывались эффективными. Наиболее многообещающим является использование сильнодействующих растительных или бактериальных токсинов, одна молекула которых может вызывать гибель клетки.

Так, например, молекула токсина дифтерии: образована двумя полипептидными цепями, связанными дисульфидными мостиками. Цепь В связывается с клеточной поверхностью, а цепь А, обладающая ферментативной активностью, проникает внутрь клетки и нарушает работу механизма биосинтеза белка. Были предприняты попытки, заменить В-цепь токсина специфическими антителами, преимущественно гомогенными. Также недавно был получен препарат моноклональных антител к антигену раковых клеток прямой кишки, ассоциированных с А-цепью токсина, который избирательно действует на эти клетки в культуре.

С помощью моноклональных антител возможно также выделение биологически активных веществ (таких, например, как белки, гормоны, токсины) из сложных смесей. В случае интерферона Сичер и Берк из Уорвикского университета (Великобритания) с помощью метода иммуноадсорбции получили препарат со степенью около чистоты 1 %.

По этому методу антитела были пришиты к углеводным гранулам и исследованы для приготовления колонки с иммуносорбентом, на которой очищали грубый препарат интерферона. После одного пассажа через такую колонку с иммобилизованными моноклональными антителами препарат очищается в 5000 раз лучше.

Можно также использовать моноклональные антитела точной идентификации специализированных клеток, таких, например, как нейтроны, чтобы глубже изучить способы их взаимодействия и функционирование (т.е. локализацию химических нейромедиаторов).

Очень ценна техника моноклональных антител и для изучения клеточных мембран. Мембранные белки трудно выделить в чистом виде. Они присутствуют в клетках в малом

количестве, их биологическую активность трудно измерить или же она и вовсе исчезает при растворении мембран в аналитических экспериментах. Эти трудности можно преодолеть, если прибегнуть к иммунологическим методам изучения мембранных белков, как это было сделано в случае антигенов клеточной поверхности, являющихся маркерами разных стадий дифференцировки тканей. Обычные препараты антител против клеточных антигенов, как правило, сложные и не способные распознавать отдельные молекулы.

Кроме того, еще одной сферой применения моноклональных антител является *терапия различных заболеваний*, так, например, эффективность серотерапии может быть увеличена благодаря применению моноклональных антител.

Также с помощью моноклональных антител можно изготавливать высокоспецифичные вакцины, особенно против определенных штаммов и паразитов.

Моноклональные антитела способны также нейтрализовать действие лимфоцитов, ответственных за отторжение трансплантата. В сочетании с лекарственными средствами они могут значительно усиливать эффективность действия последних на клетки-мишени, позволяя при этом избегать серьезных побочных явлений, столь обычных при химиотерапии рака.

5. Иммунологический анализ

Разработка Ялоу и Берсоном **радиоиммунологического анализа (РИА)** оказала глубочайшее влияние на многие области клинической медицины и науку вообще, так как он позволяет определять очень небольшие количества вещества путем вытеснения, меченного радиоактивным изотопом антигена из комплекса со специфическим антителом при добавлении все возрастающего количества немеченого испытуемого или стандартного антигена.

Особенно наглядно достоинства метода проявлялись в эндокринологии, т.к. «рабочая» концентрация гормонов очень невелика, а определение их при помощи биологических методов анализа – долгая, утомительная, иногда неосуществимая процедура. Анализируемые вещества бывают, нестабильны даже вне условий анализа, а при анализе их нередко приходится концентрировать; кроме того, они содержат примеси, которые могут обладать биологической активностью, сходной с таковой у изучаемого гормона.

Приведем один пример гормона, определение которого с помощью РИА открыло принципиально новые возможности: это *пролактин*. Применяя быстрый и относительно простой его метод его определения при помощи РИА в плазме большого числа пациентов и здоровых добровольцев, удалось установить, что повышенное содержание пролактина в плазме ассоциировано с наличием наиболее распространенного типа опухолей последнего отдела гипофиза (пролактиномы), а нередко и с индуцируемыми пролактином галактореей и аменореей и иными нарушениями менструального цикла.

Сегодня определение содержания пролактина стало важной частью исследования бесплодия и аменореи. Так, например, приблизительно у 20 % женщин с аменореей обнаруживается повышенное содержание пролактина в плазме, причиной которого может быть опухоль гипофиза, прием лекарств, вызывающих повышение уровня пролактина и другие причины.

Моноклональные антитела уже используют в коммерческих наборах для проведения РИА, и их доступность позволила предложить альтернативные методы анализа, когда используется избыток меченых антител (например, **иммунорадиометрический анализ**). Это высокочувствительные методы анализа.

Также в настоящее время широко внедряется в медицинскую практику **методы иммуноферментного анализа (ИФА)**, предназначенные для определения низких концентраций разнообразных биологически активных веществ (лекарственных препаратов, гормонов и т.п.) по их иммунохимическим свойствам. Главной их особенностью является применение в качестве метки – фермента – функционально

активной биологической молекулы. Принцип метода заключается в том, что для ИФА используют комплексы иммунореагентов: антигенов (АГ) или антител (АТ) с молекулами фермента. Комплекс молекулы фермента с иммунореагентом (АГ или АТ) называется *конъюгатом*. При этом оба компонента конъюгата: иммунореагент и фермент – сохраняют свою функциональную активность, т.е. могут образовывать иммунные комплексы и расщеплять субстрат соответственно.

Характерными чертами ИФА являются:

- 1) *высокая специфичность*, присущая реакциям АГ – АТ, т.е. иммунореагентам;
- 2) *высокая чувствительность*, обеспечиваемая ферментом, т.к. молекулы конъюгированного фермента, как и фермента свободного, способны расщеплять множество молекул соответствующего субстрата с образованием легко обнаруживаемых продуктов.

Результаты анализа оцениваются *визуально* и *инструментально* по оптической плотности окрашенных продуктов реакции. Для измерения оптической плотности используют спектрофотометрами, или так называемыми ИФА-ридерами.

Различают два вида ИФА: гомогенный и гетерогенный.

Гомогенный ИФА или ИФА без разделения компонентов (ЕМІТ)

С помощью данного метода анализа можно измерить ферментативную активность исследуемого образца без разделения свободных и связанных с АТ меченых АГ.

Суть гомогенного варианта ИФА состоит в ингибировании или индуцировании активности фермента в результате воздействия иммунореагентов. Каталитическая активность фермента зависит его пространственной структуры, обусловленной многочисленными нековалентными и дисульфидными связями, но нековалентные химические связи непрочны и легко разрушаются или ослабляются под влиянием различных факторов. Одним из них являются и дополнительные нековалентные взаимодействия, которые приводят к изменению пространственной структуры молекулы фермента, а, следовательно, и его каталитической активности. Если активность меченых ферментом АГ, связанных с АТ, заметно отличается от активности свободных меченых АГ, то можно измерить ферментативную активность исследуемого образца без разделения свободных и связанных с АТ меченых АГ.

Кроме ферментов при гомогенном ИФА в качестве метки могут быть использованы модуляторы – ингибиторы или индукторы ферментов, способные изменять активность индикаторного фермента. Гомогенный ИФА в основном используют для быстрого определения в биологических жидкостях низкомолекулярных АГ: токсинов, стероидных гормонов, гаптенов и лекарственных препаратов.

Итак, сущность рассматриваемого метода, применяемого для анализа низкомолекулярных антигенов, состоит в следующем. Антиген ковалентно связывают с ферментом вблизи его активного центра так, чтобы фермент, с одной стороны, сохранял свою активность, а с другой – терял ее при связывании антигена с антителом. Последнее происходит в результате блокировки активного центра объемистой молекулой антитела. Модифицированный ферментом антиген смешивают с антителом. К этой смеси добавляют определяемый антиген, который вытесняет модифицированную молекулу из комплекса с антителом. В результате появляется ферментативная активность, величина которой пропорциональна концентрации определяемого вещества.

ЕМІТ применяется в клинической практике для быстрого определения отравлений лекарствами и наркотическими средствами. Метод пригоден для определения многих соединений: гормонов, наркотических средств, барбитуратов и др.

В случае гетерогенного или твердофазного ИФА, называемого также фермент-зависимым иммуносорбентным анализом (ELISA): иммунореагенты (АГ или АТ) фиксируются на твердой фазе. Неприсоединившиеся компоненты реакции легко удаляются при обязательной процедуре отмывания после каждого этапа анализа.

Таким образом, один из компонентов, антитело или антиген, иммобилизуют на поверхности твердого носителя, а определенное вещество (соответственно антиген или антитело) пропускают через колонку с этим носителем, который предварительно был переведен в комплекс с определенным веществом, содержащим ковалентно привязанный фермент-маркер. Определяемое вещество конкурирует с меченым и по концентрации «вымытого» фермента вычисляют количество определяемого вещества. Использование ферментов как маркеров основано на том же принципе, что и при *фотоэнзографии*: 1 молекула фермента производит много молекул продуктов ферментной реакции, т.е. фактически может детектировать достаточно высокие концентрации этих продуктов и обычными физико-химическими методами.

Данный метод называют анализом с разделением компонентов; он высокочувствительный, простой, широко используется в медико-биологических исследованиях, используются для массовой диагностики вирусных и инфекционных заболеваний, выявления иммунных комплексов, определения изотипов антител.

В качестве твердой фазы для проведения ИФА используют такие материалы, как полистирол, поливинилхлорид, полипропилен, гели декстрана, полиакриламид, агарозы, целлюлозу, нитроцеллюлозу, нейлон и др. Твердая фаза может быть в виде пробирок, планшетов для микротитрования, шариков, пленок. В настоящее время чаще всего используются пластиковые планшеты для титрования с 96 лунками, имеющими плоское дно. Такие планшеты удобны как в работе, так и при оценке полученных результатов на ИФА-ридерах.

Большинство АГ различной химической природы (белки, нуклеиновые кислоты, пептиды, полисахариды, липополисахариды) и АТ самопроизвольно адсорбируется на поверхности пластика. Степень адсорбции зависит от физико-химических свойств молекул, от концентрации в растворе, отношения площади связывания к объему внесенного образца, времени инкубации, температуры.

Лучше всего белки адсорбируются при высоких значениях рН, поэтому обычно для посадки АГ или АТ используют 0,05 М карбонат-бикарбонатный буфер, рН 9,6. Оптимальная концентрация чистых белковых иммунореагентов для сенсibilизации составляет 1 – 10 мкг/мл, при этом в лунки вносят по 50 – 100 мкл раствора иммунореагента. Инкубируют раствор в планшете 12 – 14 ч в холодильнике при 4 °С. Адсорбировавшиеся на пластике АГ или АТ не смываются буфером, содержащем детергент, в то время как несвязавшиеся с твердой фазой молекулы фермента легко удаляются из лунок при отмывании.

Можно применять гетерогенный ИФА и при работе с корпускулярными АГ: клетками бактерий, эукариот, вирусами, хромосомами и т.п. Клетки бактерий прикрепляют на пластиковую поверхность высушиванием. Для укрепления такой связи прикрепившиеся клетки можно зафиксировать 0,1 – 0,25 % глутаровым альдегидом. При такой фиксации лишь незначительная часть эпитопов будет денатурировать.

Наиболее распространенными ферментами-маркерами, применяемыми в ИФА, являются пероксидаза хрена и щелочная фосфатаза, а растворимыми субстратами для этих ферментов – соответственно ортофенилендиаминдигидрохлорид (ОДФ) и N, п-нитрофенилфосфат щелочной (ПНФФ).

Для выявления и количественного определения АГ и АТ применяют различные варианты гетерогенного ИФА с адсорбцией на твердой фазе АТ или АГ. Различают методы *последовательного*, и *конкурентного анализа*. На практике чаще всего применяют различные варианты последовательного гетерогенного ИФА.

Наиболее простыми вариантами ИФА, при которых образуются двухслойные иммунные комплексы, являются *прямые методы*. При проведении прямого ИФА лунки планшета сенсibilизируют АГ или АТ, блокируют оставшиеся свободными места на твердой фазе, после чего в лунки добавляют меченые ферментом АТ или АГ. При этом содержащий фермент иммунореагент связывается с твердой фазой лишь тогда, когда

иммунореагенты взаимно комплементарны. Такой вариант ИФА используют для обнаружения АГ в образце, адсорбированном на твердой фазе, а также для контроля качества меченых ферментом АТ, например, антиглобулиновых. В последнем случае на поверхность лунок адсорбируют стандартный специфический АГ и по завершении сенсibilизации, блокировки и отмывок в лунки раститровывают анализируемый конъюгат. После инкубации и отмывания несвязавшихся компонентов в лунки вносят раствор субстрата. По завершении ферментативной реакции полученные результаты сравнивают с референс-образцом конъюгата.

Непрямой метод твердофазного ИФА был разработан в начале 70-х гг. Этот вариант ИФА проводят с использованием антивидовых конъюгатов, что позволяет решать проблемы серодиагностики самых разных заболеваний, имея ограниченный выбор антивидовых иммуноферментных конъюгатов. Кроме того, такой вариант ИФА применяют для повседневного анализа культуральной жидкости гибридом на наличие специфических моноклональных АТ, используя конъюгат, специфичный к иммуноглобулинам мыши.

Для определения в образцах АГ и иммунных комплексов широко применяется *«сэндвич»-вариант ИФА*. «Сэндвич»-вариант ИФА проводится по следующей схеме. Высокоаффинные или моноклональные АТ адсорбируют на твердую фазу и блокируют оставшуюся свободной поверхность пластика. Затем в лунки вносят исследуемый материал, положительный и отрицательный контроли. После инкубации и отмывания в лунки вносят конъюгат – меченые ферментом АТ, а также АГ. Далее вносят субстрат и следят за развитием цветной реакции. В ходе работы искомым АГ оказывается «зажатым» между молекулами АТ. Это позволило назвать данный вариант ИФА «сэндвич»-вариантом. Понятно, что исследуемый в «сэндвич»-варианте АГ должен обладать, как минимум, двумя сходными эпитопами.

Разновидностью «сэндвич»-варианта является анализ для выявления АТ и иммунных комплексов. В этом случае ферментную метку присоединяют не к АТ, взаимодействующим с АГ, а к антиглобулиновому реагенту, который связывается с АТ, входящими в состав иммунных комплексов.

Стоит также упомянуть о варианте ИФА, основанном на ингибировании антигеном. Этот метод применяют для выявления и количественного определения АГ в растворе. Стандартный АГ адсорбируют в лунках планшета и подбирают оптимальное разведение конъюгата. Добавление даже минимальных количеств раствора АГ к конъюгату в оптимальном разведении ингибирует взаимодействие меченых АТ с адсорбированным на твердой фазе АГ. Степень ингибирования при этом прямо пропорциональна содержанию АГ в растворе, что позволяет и количественно оценить содержание АГ в растворе. Таким образом, если конъюгат в оптимальном разведении проинкубировать с последовательными разведениями образца, содержащего АГ, после чего внести эту смесь в лунки с адсорбированным АГ, то свободный АГ, связавшись с мечеными АТ, воспрепятствует связыванию этих АТ с АГ на твердой фазе. Следовательно, меньшее количество фермента, входящего в состав конъюгата, свяжется с твердой фазой, что и приведет к ослаблению ферментативной реакции на заключительном этапе анализа.

Варианты ИФА (конкурентный ИФА с адсорбированными и конкурентный ИФА с адсорбированными АТ) основаны на принципе конкуренции за место связывания. Здесь так же, как и в описанном выше случае, сначала необходимо определить оптимальные концентрации иммунореагентов, после чего исследовать тестируемый материал. Реакцию проводят, смешивая и инкубируя исследуемые образцы с меченым ферментом АТ. При наличии в образце АТ, гомологичных адсорбированному на твердой фазе АГ, эти АТ будут конкурировать с конъюгатом за присоединение к АГ. Чем выше концентрация свободных АТ в образце, тем меньше молекул фермента, входящего в состав конъюгата, присоединится к твердой фазе, и ферментативная активность пропорционально снизится.

К недостаткам метода ELISA можно отнести длительность анализа. Высокой экспрессивностью обладают гомогенные методы анализа ЕМІТ.

Схема проведения ИФА:

1. Первый этап любого из рассматриваемых вариантов ИФА заключается в сенсibilизации твердой фазы – лунок планшета для титрования – АГ или АТ. При постановке каждого опыта необходимо предусмотреть положительный и отрицательный контроль. Положительный контроль ставят в лунках, сенсibilизированных стандартными образцами АГ или АТ, отрицательный контроль – в лизированных стандартными образцами АГ или АТ, отрицательный – в лунках, сенсibilизированных растворами, заведомо не содержащими специфического иммунореагента. Кроме того, как правило, несколько лунок отводят для контроля субстрата и контроля конъюгата, при котором выявляют неспецифическое связывание конъюгата.

2. Вслед за сенсibilизацией проводится блокировка свободной поверхности твердой фазы. После адсорбции иммунореагента свободные места на твердой фазе блокируют для предупреждения неспецифического связывания на последующих этапах ИФА. Для блокировки используют различные белки (чаще всего 1 % раствор бычьего сывороточного альбумина).

3. При выполнении прямого варианта ИФА после сенсibilизации и блокировки в систему вносят меченый ферментом иммунореагент – конъюгат. Условия и время инкубации устанавливаются эмпирически.

4. После инкубации и отмывки в лунки планшета вносят специфический для используемого фермента субстрат и по достижении оптимального окрашивания в лунках с положительным контролем реакцию останавливают и измеряют оптическую плотность растворов на ИФА-ридере при соответствующей длине волны.

Таким образом, чаще всего ИФА используют для определения мест локализации антигенов в гистохимических анализах и их концентраций в биологических жидкостях.

Количественные методы ИФА развиваются с начала 70-х гг. и в настоящее время их используют для определения иммуноглобулинов, гормонов, вирусных и бактериальных антигенов, лекарственных препаратов, антител к различным антигенам. Методы характеризуются чрезвычайно высокой чувствительностью и абсолютной селективностью, что делает их незаменимыми в ранней диагностике и контроле заболеваний.

Что дает медицине применение этих методов? Количество иммуноглобулинов в сыворотке крови человека служит показателем иммунного статуса организма и важным диагностическим признаком при некоторых заболеваниях. Выявление изменений концентрации гормонов – существенная проблема современной эндокринологии. Такой анализ необходим для диагностики и контроля за эффективностью терапии ряда заболеваний. ИФА используют также для определения поверхностного антигена гепатита В и раково-эмбрионального антигена. Появилась возможность обнаруживать на ранних стадиях заболевание печени или злокачественные образования и своевременно применять методы терапии.

Благодаря ИФА стало легче выявлять антитела к различным антигенам в сыворотке крови пациентов. Метод широко используют в диагностике по данным анализа крови, ибо увеличение содержания в организме антител к какому-либо вирусному или бактериальному антигену позволяет на ранних стадиях распознавать природу заболевания. Обычно применяют модификацию ИФА. Предполагаемый антиген связывают с нерастворимым носителем и соединяют с сывороткой крови. Если в ней есть антитела, то они свяжутся с антигеном, на носителе. Затем такой носитель обрабатывают раствором, содержащим меченные ферментом антитела какого-либо животного. Они связываются с попавшими из крови пациента антителами на носителе, в результате чего

появляется детектируемая ферментная активность носителя. Такой метод разработан для диагностики бруцеллеза, сифилиса, гельминтоза и т.п.

Для проведения подобных анализов созданы автоматизированные системы, позволяющие исследовать до 1000 сывороток в день. Перспективность ИФА, а также других аналитических методов с использованием ферментов совершенно очевидна. Она обусловлена их уникально высокими чувствительностью и селективностью, простотой оборудования и возможностью автоматизации. Однако лишь немногие из них широко внедрены в практику. Причина этого – в инерции промышленности, производящей оборудование и наборы реактивов.