

ПОЛУЧЕНИЕ НОВЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К СА 15–3

А.К. Могильных, М.А. Малыхина, Л.А. Усикова, О.С. Мокрушина, Е.Б. Шеметова, М.А. Сорокин, И.А. Вторушина, Е.Н. Алексеенко, В.А. Порываева, О.А. Агафонова, М.Ю. Рукавишников

АО «Вектор-Бест, Новосибирская область, р.п. Кольцово, Россия

Введение. Опухолевый маркер СА 15–3 (муцин-1, MUC1) используется для мониторинга течения рака молочной железы, контроля эффективности проводимого лечения и раннего выявления рецидивов заболевания. СА 15–3 – это трансмембранный муцин, который имеет различное количество высоко О-гликозилированных tandemных повторов из 20 аминокислот (1).

Цели и задачи. Получение коллекции гибридом, продуцирующих моноклональные антитела (МкАТ) к опухолевому маркеру СА 15–3 с использованием генно-инженерного белка и дальнейший отбор антител для диагностики.

Материалы и методы. Шесть мышей линии BALB/c иммунизировали рекомбинантным белком СА 15–3 (гес СА 15–3), экспрессированным в клетках CHO. ДНК последовательность, кодирующая рекомбинантный белок MUC1, кроме целевой последовательности гена, содержала N-концевой сигнальный пептид для секреции СА 15–3 в средовое пространство и 10-His tag для его эффективной очистки. Был получен пул стабильных клеток-продуцентов. Очистка целевого белка из культуральной среды на смоле Ni-NTA проводилась по стандартному протоколу, молекулярная масса составила около 200 кДа.

Схема иммунизации мышей состояла из трехкратного введения антигена в полном и неполном адьювантах Фрейнда с интервалами 1–2 месяца и дозой 10–15 мкг/мышь, метод введения антигена – внутрибрюшинно или подкожно, общее время иммунизации 5 месяцев. Непрямым твердофазным ИФА сыворотки крови с гес СА 15–3 отобрали двух мышей с высокими титрами АТ. Бустерную дозу (суммарно 770 мкг антигена на мышь) вводили внутрибрюшинно и внутривенно за 1–3 дня до слияния спленоцитов иммунизированных мышей с клетками мышиной миеломы NS-1 с использованием ПЭГ-4000. Культуру после гибридизации вели на селективной среде НАТ. Позитивные гибридомы отбирали в непрямом ИФА по реакции АТ в культуральных супернатантах с гес СА 15–3.

Результаты. В итоге заморожено 279 гибридом с синтезом целевых АТ. Характеристика АТ полученных гибридом включала в себя определение титров методом непрямого ИФА, изотипов набором производства «Bio-Rad», индекса аффинности (ИА) с 6М раствором мочевины. Гибридомы, синтезирующие антитела изотипа IgG1, IgG2a или IgG2b, с высокими ИА и титрами в реакции с гес СА 15–3, клонировали методом лимитирующих разведений. МкАТ отклонированных гибридом нарабатывали в мышах, очищали методом аффинной хроматографии на SpA-сефарозе и синтезировали их конъюгаты с пероксидазой хрена. Пары МкАТ/пероксидазный конъюгат исследованы в качестве компонентов «сэндвич» – варианта ИФА для количественного определения СА 15–3 в сыворотке крови людей. Найдены два МкАТ класса IgG1, позволяющие выявлять СА 15–3 в концентрациях от 0,5 Ед./мл. Данные МкАТ также показали высокую стабильность при хранении.

Выводы. Получена и исследована коллекция гибридом со стабильным синтезом антител к онкомаркеру СА 15–3. Найдены два МкАТ, пригодных для количественного определения содержания СА 15–3 методом «сэндвич» – ИФА.

Литература

1. Chen W., Zhang Z., Zhang S.; Zhu P., Ko J.K. – S., Yung K.K. – L. MUC1: Structure, Function, and Clinic Application in Epithelial Cancers. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 6567.