

УДК 616-097:616-006-018:576.3.017.2:616.5-006.81]:576.3.08

Н.В. Голубцова, О.С. Бурова, К.А. Барышников, М.В. Оборотова, В.И. Карасева, Л.Т. Мамедова,
К.И. Жордания, М.А. Барышникова, А.С. Гриневич, П.К. Иванов, А.Ю. Барышников

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА ICO-406 ПРОТИВ АНТИГЕНА CD117

ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

Контактная информация

Голубцова Наталья Валерьевна, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДнТО

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; тел: +7(499)324-10-65

e-mail: ngolubcova@mail.ru

Статья поступила 29.04.2015, принята к печати 12.05.2015.

Резюме

Получены МКА против антигена CD117 – маркера стволовых опухолевых клеток человека. Штамм ICO-406 получали путем слияния клеток мышиной миеломы NS-1 с клетками селезенки мышей линии BALB/C, предварительно трехкратно иммунизированных с интервалом в две недели клетками клеточной линии меланомы кожи человека mel Kor. Слияние проведено при помощи раствора ПЭГ/ДМСО. Для скрининга полученных МКА ICO-406 использовались клеточные линии меланомы человека, различающиеся экспрессией антигена CD117 из коллекции ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина». Экспрессию антигена изучали в РИФ и оценивали на проточном цитофлуориметре BD FACSCantoTMII. МКА ICO-406 сравнивали с коммерческими МКА против антигена CD 117 (Германия). Результаты показали их идентичность по частоте антиген-положительных случаев и проценту антигенположительных клеток. МКА ICO-406 блокируют связывание с клетками mel Kor МКА анти-CD117. Связывание МКА ICO-406 с антиген-положительными клетками вызывает модуляцию антигена CD117.

Ключевые слова: моноклональные антитела, антиген, стволовые опухолевые клетки, меланома кожи человека, проточная цитометрия.

N.V. Golubtsova, O.S. Burova, K.A. Baryshnikov, M.V. Oborotova, V.I. Karaseva, L.T. Mamedova,
K.I. Zhordania, M.A. Baryshnikova, A.S. Grinevich, P.K. Ivanov, A.Yu. Baryshnikov

MONOCLONAL ANTIBODIES ICO-406 AGAINST THE ANTIGEN CD117

FSBSI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», Moscow

Abstract

mAb against the antigen CD117 – stem marker of human tumor cells. Strain 406 PPI prepared by cell fusion of mouse myeloma NS-1 cells with spleen mice BALB/ C, pre-immunized three times at an interval of two weeks, the cells of the cell line of human melanoma melKor. Merging conducted using a solution of PEG/DMSO. For screening received mAb 406 used human melanoma cell lines which differed in the expression of CD117 antigen FSBSI "N.N. Blokhin RCRC" collection. N.N. Blokhin. Antigen expression was studied in immunofluorescence and evaluated on a flow cytometer BD FACS CantoTMII. ICA ICO-406 was compared with commercial ICA against antigen CD 117 (Germany). The results indicated the identity of the frequency of antigen-positive cases and the percentage of antigen cells. ICA ICO-406 block binding to cells melKor ICA anti-CD117. Linking ICA ICO-406 antigen-positive cells causes modulation of antigen CD117.

Key words: monoclonal antibodies, antigen, stem tumour cells, human skin melanoma, flow cytometry.

Введение

Среди опухолевых клеток имеется небольшая популяция клеток, способных к формированию дифференцированных опухолевых клеток, а также способных к собственному воспроизведению, т.е. имеющих характеристики стволовой клетки [7; 20; 22]. В гематологических опухолях также выявлена популяция клеток со свойствами стволовых [4; 10; 12]. Эти клетки получили название опухолевых

стволовых клеток (СОК) [14]. Первоначально СОК были обнаружены при остром миелоидном и хроническом миелоидном лейкозах [12; 16; 17; 23; 24]. Эти клетки характеризовались экспрессией CD34 антигена [9]. В последующем ОСК были идентифицированы при многих злокачественных заболеваниях.

Фактор роста стволовых клеток (SCF или KL) CD117(c-Kit) – гемопоэтический ростовой фактор. Он является цитокиновым рецептором, экс-

прессированном на клеточной поверхности гемопоэтических стволовых клеток, а также некоторых других клеток [4; 15]. Измененные формы рецептора ассоциированы с некоторыми типами рака [15]. CD117 является рецепторной тирозинкиназой III типа, рецептором для стволового фактора роста c-Kit. CD117 взаимодействует со многими другими белками: APS, BCR, CD63, CD81, CD9, CRK, CRK1, DOK1, FES, GRB1, Grb2, KITLG, LNK, MPDZ, PIK3R1, PTPN11, PTPN6, STAT1, SOCS1, SOCS6, TEC.

Рецептор CD117 является обязательным компонентом клеточной поверхности гемопоэтических стволовых клеток и прогениторных клеток. Доказано его участие в поддержании циркулирующих гемопоэтических стволовых клеток, а также в механизмах, позволяющих этим клеткам возвращаться из системного кровотока в их ниши в костном мозге.

Более 90 % нейтральных стволовых и прогениторных СОК несут на своей поверхности CD117. Взаимодействие SCF с c-Kit активирует многочисленные сигнальные каскады, включая RAS/ERK, PI3-K, JAK/STAT, Src-киназы, результатом чего является направленная миграция, выживание и пролиферация стволовых клеток. Антиген обнаружен на клеточных линиях меланомы кожи [11].

Иммунологический фенотип СОК характеризуется экспрессией различных антигенов: CD24, CD34, CD44, CD90, CD117, CD133, CD271 [4–11; 13]. Антигены CD24, CD34, CD90, определяются МКА ICO-150, ICO-115, ICO-10 соответственно [1; 3; 5; 13].

Целью настоящей работы явилось получение МКА против антигена CD117 – маркера СОК человека.

Материалы и методы

МКА ICO-406 получали путем слияния клеток мышиной миеломы NS-1 с клетками селезенки мышей линии BALB/C, предварительно трехкратно

Очистка и мечение МКА

Реагенты:

ДМСО (DMSO) – диметилсульфоксид безводный (Applichem #A3672.0050)

ДТТ (DTT) – дитиотриэтол (Serva #39759)

ФЭ (PE) – R-фикоэритрин (Fluka #52412)

PBS – 0,1 М фосфат-солевой буфер, pH 7,2 – 7,4

PBS-ЭДТА – PBS с 1 мМ этилендиамином тетраацитом

NEM – N-этил малеимид (ABSR #209300)

SMCC – Сукцинимидил 4 [N-малеимидометил] циклогексан-1-карбоксилат (Fluka #63181)

SPDP – N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио) пропионат (Sigma #P3415)

Tris-HCl – 10 мМ Трис-HCl буфер, pH 7,8

TBS – 10 мМ Трис-буфер, 150 мМ NaCl, 0,02% NaN₃ pH 7,8

Для очистки IgG 5–10 мл асцитной жидкости осветляли центрифугированием 60 мин при 4000 об/мин.

Асцитную жидкость термостатировали при +4 °С при постоянном перемешивании на магнитной мешалке и капельно добавляли равный объем насыщенного при +4 °С раствора сульфата аммония в течение 15–20 минут. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием (30 мин. при 4000

иммунизированных с интервалом в две недели клетками клеточной линии меланомы кожи человека mel Kog (происхождение – подкожный метастатический узел пациентки диссеминированной меланомой кожи). Слияние проведено при помощи раствора полиэтиленгликоля ПЭГ/ДМСО («Sigma»). Одну из гибридом, супернатант которой выявлял около 70–80 % АГ⁺ клеток, дважды клонировали методом лимитирующих разведений. Для скрининга полученных МКА ICO-406 при помощи реакции иммунофлуоресценции использовались клеточные линии меланомы человека, различающиеся экспрессией антигена CD117, из коллекции ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» [11].

Реакция иммунофлуоресценции

Экспрессию антигена определяли в реакции иммунофлуоресценции. 5×10⁵ клеток (mel Kog и др.) инкубировали с 20 мкл МКА в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего 10 мин отмывали в 1 мл PBS при 1500 об/мин.

К осадку клеток добавляли 10 мкл F(ab)₂ (goat anti mouse IgG: FITC, фирмы Serotec, кат.№ 0106) и инкубировали в течение 30 мин при +4 °С. После этого клетки дважды отмывали в 1 мл PBS в тех же условиях, осадок клеток ресуспендировали в 300 мкл 1 %-ного р-ра формалина.

Реакция прямой иммунофлуоресценции

5×10⁵ клеток (mel Kog и др.) инкубировали с 10 мкл антител, меченных PE в течение 30 мин при +4 °С, после чего клетки дважды отмывали по 10 мин в 1 мл PBS при 1500 об/мин, осадок клеток ресуспендировали в 300 мкл 1 %-ного р-ра формалина. Полученные результаты оценивали на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto™ II USA. Реактивы для буферов использовали компании «ПанЭКО» (Россия). Анализ данных, полученных с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCanto™ II (USA).

об/мин) и ресуспендировали в TBS в объеме, равном 0,5 объема исходного асцита. Процедуру высаживания повторяли еще раз. Полученный осадок отделяли центрифугированием (30 мин при 4000 об/мин) и ресуспендировали в TBS. Полученный препарат переводили в Tris-HCl на колонке PD-10 и

наносили на колонку Mono Q 10/100, уравновешенную тем же буфером. Это и последующие разделения проводили на хроматографе ÄKTA purifier 10. Скорость потока составляла 1 мл/мин, выход белковых продуктов оценивали денситометрией при 280 нм. После отмывки колонки от не связавшейся белковой фракции, на колонку подавали градиент 0–40 % 1М раствора NaCl на Tris-HCl.

Выходящие фракции собирали по 1 мл, и в последующем анализировали SDS-ПААГ электрофорезом по Лэммли на наличие IgG. Фракции, имеющие молекулярную чистоту 95–98 % объединяли. Препарат IgG дополнительно очищали гелифльтрацией на колонке Superdex 200 10/300.

На колонку наносили 0,6–0,8 мл образца IgG, и проводили разделение со скоростью потока 0,5 мл/мин, выход белковых продуктов оценивали денситометрией при 280 нм. Фракции, соответствующие выходу гомогенного по молекулярной массе IgG, объединяли, переводили в PBS-ЭДТА, концентрировали до 8–12 мг/мл и стерилизовали через шприц-насадку 0,22 мкм.

Конъюгирование IgG с PE проводили по методам [18; 21] с модификациями. В мечение брали 300–350 мкг IgG и 1 мг PE, что соответствуют молярному соотношению 1 : 2. PE ресуспендировали в 0,5 мл PBS-ЭДТА и обессоливали на PD-10 против того же буфера. Полученный материал концентрировали на Centricon 30 (Millipor) до 0,5–0,7 мл, добавляли 16 мкл SPDP в DMSO в концентрации 1,33 мг/мл и инкубировали в темноте при комнатной температуре при постоянном перемешивании 2,5 часа.

За 0,5 часа до окончания инкубации PE, к IgG в концентрации 2,5 мг/мл и добавляли 5 мкл раствора SMCC в DMSO в концентрации 1,75 мг/мл. Смесь оставляли при комнатной температуре с периодическим встряхиванием на 1 час. По окончании инкубации PE, к нему добавляли 30 мкл 0,5 М раствора DTT в PBS-ЭДТА и инкубировали еще 0,5 часа при тех же условиях.

После инкубации модифицированные PE и IgG освобождали от продуктов реакции и не прореагировавших реагентов на колонках PD-10 против PBS-ЭДТА. Полученные с колонок PE и IgG концентрировали на Centricon 30 до совместного объема 0,8–1,2 мл, после чего PE и IgG объединяли в пробирке и инкубировали в темноте при +4 °C при постоянном перемешивании 16–18 ч.

Реакцию останавливали добавлением 40 мкл 0,1 мМ раствора NEM в DMSO с последующей инкубацией при комнатной температуре при постоянном перемешивании в течение 45 мин.

Полученный образец концентрировали на Centricon 30 до объема 0,5–0,6 мл и фильтровали на Spin-X (Millipor).

Разделение продуктов конъюгации проводили на колонке Superdex 200 10/300, при скорости потока 0,5 мл/мин с денситометрией при 280 и 565 нм. Фракции собирали по 1 мл.

Собранные фракции анализировали на соотношение IgG – PE [19]:

Молярная концентрация $[IgG] = [(A_{280} \text{ нм} - 0,18 \times A_{565} \text{ нм}) / 203,000] \times \text{фактор разведения}$;

Молярная концентрация $[R-PE] = (A_{\text{max}} / 1,960,000) \times \text{фактор разведения}$,

где A_{max} должна быть в диапазоне 0,3–0,8 при измерении на 565 нм;

Степень включения $PE = [R-PE] / [IgG]$,

где степень включения должна быть в пределах 0,7–2,0.

После разделения препараты антител стабилизировали бычьим сывороточным альбумином в конечной концентрации 10 мг/мл, консервировали 0,1 %-ным NaN_3 и стерилизовали через шприц-насадку 0,22 мкм.

Результаты и обсуждение

Тестирование полученных МКА ICO-406 на клеточной линии меланомы кожи человека mel Kog выявило 100 % антиген-положительных клеток. В качестве положительного контроля для CD117 использовали МКА CD117 (A3C6E2)-APC («MACS Miltenyi Biotec», Германия), которые также реагировали с 100 % этих клеток. Гистограммы распределения клеток mel Kog, окрашенных МКА ICO-406 и МКА анти-CD 117, представлены на рис. 1. Сходство профилей флуоресценции МКА ICO-406 и МКА CD117 позволило предположить, что эти антитела распознают один и тот же антиген.

Для следующего этапа в изучении специфичности МКА ICO-406 использовали метод конкурентной ингибиции. Клетки линии mel Kog первоначально инкубировали с избытком немеченых МКА ICO-406, после чего инкубировали с МКА ICO-406PE или анти-CD117APC. Проведенные эксперименты показали, что инкубация клеток mel Kog с насыщающей концентрацией МКА ICO-406 приводит к полной блокаде связывания с этими клетками меченых PE МКА ICO-406 и меченых APC МКА анти-CD117 (рис. 2).

Таким образом, можно сделать вывод, что МКА ICO-406 распознают тот же самый или близко расположенный эпитоп, что и МКА CD117.

Для дальнейшей характеристики МКА ICO-406 был использован метод антигенной модуляции. Преинкубация клеток mel Kog с МКА ICO-406 приводила к исчезновению с клеточной поверхности антигена CD117, выявляемого МКА CD117 APC. Антиген полностью исчезал с клеточной поверхности через 2 ч после начала инкубации при +37 °C (рис. 3) с МКА и отсутствовал в течение 20 ч (срок наблюдения). Эти результаты свидетельствуют о том, что МКА ICO-406 реагируют с той же самой молекулой, что и МКА CD117APC.

Таким образом, по результатам характеристики МКА ICO-406 можно сделать вывод, что гистограммы иммунофлуоресценции антиген-положительных клеток, окрашенных МКА ICO-406 и анти-CD117 идентичны, оба МКА распознают тот же самый или близко расположенный эпитоп, оба МКА реагируют с одной и той же молекулой, которая исчезает с поверхности клетки после контакта с МКА.

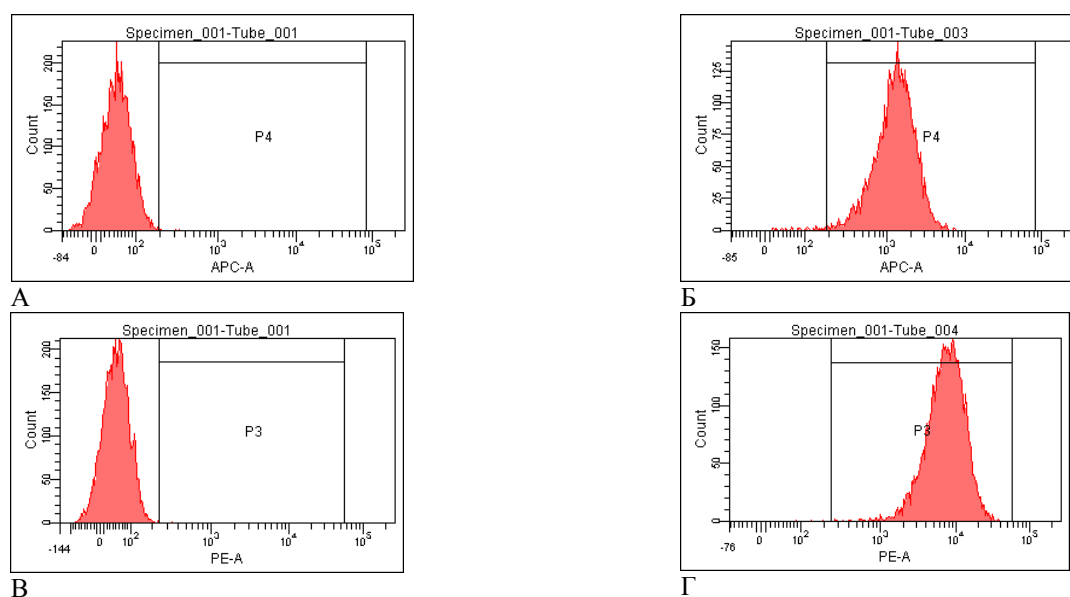


Рис. 1. Гистограммы распределения клеток *mel Kor*, окрашенных МКА ICO-406 и анти-CD117:

- А – отрицательный контроль;
 Б – гистограмма распределения клеток окрашенных МКА анти-CD117, меченных APC;
 В – отрицательный контроль;
 Г – гистограмма распределения клеток окрашенных МКА ICO-406, меченных фикоэритрином (PE).

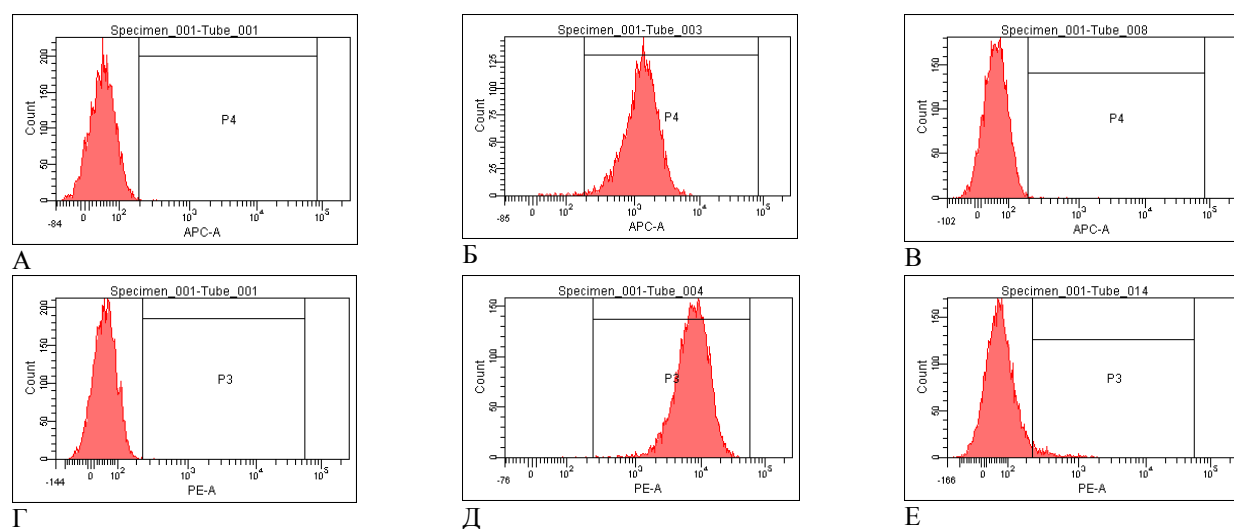


Рис. 2. Конкурентная ингибция связывания МКА ICO-406 с CD117 (A3C6E2)-APC («MACS Miltenyi Biotec», Германия) против антигена CD117:

- А – отрицательный контроль;
 Б – гистограмма распределения клеток окрашенных МКА анти-CD117, меченных APC;
 В – клетки линии *mel Kor*, инкубированные с насыщающей концентрацией МКА ICO-406 и проявленные МКА CD117 (A3C6E2)-APC;
 Г – отрицательный контроль;
 Д – гистограмма распределения клеток, окрашенных МКА ICO-406PE;
 Е – клетки линии *mel Kor*, инкубированные с насыщающей концентрацией МКА ICO-406 и проявленные МКА ICO-406 PE.

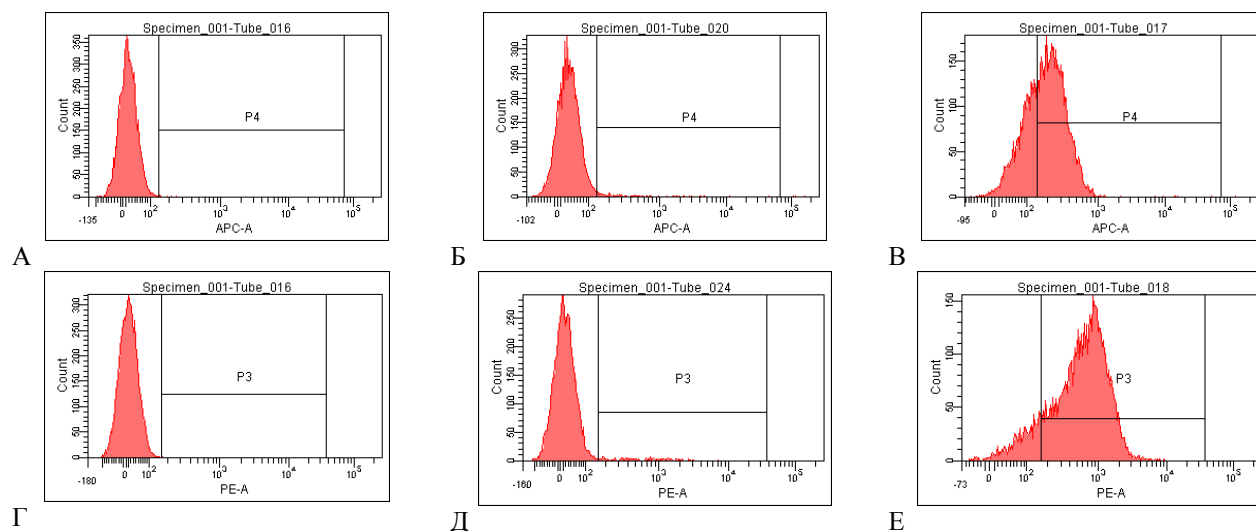


Рис. 3. Модуляция антигена CD117 МКА CD117 (A3C6E2)-APC («MACS Miltenyi Biotec», Германия):

А – отрицательный контроль;

Б – клетки линии mel K07, инкубированные с насыщающей концентрацией МКА ICO-406 в течение 2 часов при 37 °С и проявленные МКА CD117;

В – клетки линии mel K07, инкубированные с насыщающей концентрацией МКА ICO-406 в течение 20 часов при 37 °С и проявленные МКА CD117;

Г – отрицательный контроль;

Д – клетки линии mel K07, инкубированные с насыщающей концентрацией МКА ICO-406 в течение 2 часов при 37 °С и проявленные МКА ICO-406 PE;

Е – клетки линии mel K07, инкубированные с насыщающей концентрацией МКА ICO-406 в течение 20 часов при 37 °С и проявленные МКА. ICO-406 PE.

Литература

1. Барышников А.Ю., Тоневский А.Г. Моноклональные антитела в лаборатории и клинике. – М.: Медицина, 1997. – 212 с.
2. Барышников А.Ю., Голубцова Н.В., Бурова О.С. и др. Экспрессия антигена CD44 у больных метастатической меланомой кожи // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – №4. – С. 17–20.
3. Барышников А.Ю. Моноклональные антитела серии ИКО к дифференцировочным антигенам лимфоцитов человека // Гематология и трансфузиология. – 1990. – №8. – С.4.
4. Барышников А.Ю. Иммунологический фенотип ранних гемопоэтических клеток-предшественников человека // Экспериментальная онкология. – 1993. – Т. 15, № 6. – С. 3–7.
5. Барышников А.Ю., Короткова О.В., Тулицын Н.Н. и др. Моноклональные антитела ИКО-10 к антигену Thy-1 // Бюлл. эксперим. биол. мед. – 1989. – № 1. – С. 74–7.
6. Боценовский В.А., Барышников А.Ю. Молекулы клеточной адгезии // Успехи современной биологии. – 1994. – Т. 114, № 6. – С. 741.
7. Брюховецкий И.С., Брюховецкий А.С., Моценко П.В., Хотимченко Ю.С. Роль системных механизмов миграции и хоуминга стволовых клеток в развитии злокачественных опухолей центральной нервной системы и разработка новых методов противоопухолевой терапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 4. – С. 3–12.
8. Брюховецкий И.С., Брюховецкий А.С., Мищенко П.В. и др. Миграция гемопоэтических стволовых клеток человека к клеткам глиобластомы линии U87 in vitro // Российский биотехнологический журнал. – 2014. – Т. 13, № 4. – С. 31–6.
9. Заботина Т.Н., Седяхина Н.П., Хорошко Н.Д. и др. Коэкспрессия антигена CD34 ранних гемопоэтических предшественников и антигена Fas/APO-1, опосредующего апоптоз // Экспериментальная онкология. – 1994. – Т. 16, № 4–6. – С. 343–7.
10. Кадагидзе З.Г., Тулицын Н.Н., Заботина Т.Н. и др. Иммунофенотипические и функциональные особенности стволовых клеток лейкозов // Российский онкологический журнал. – 1996. – № 1. – С. 43–8.
11. Оборотова М.В., Бурова О.С., Барышникова М.А. и др. Экспрессия маркеров стволовых опухолевых клеток на клеточных линиях меланомы человека // Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т. 14, № 1. – С. 11–4.
12. Туркина А.Г., Моисеев И.Н., Фролова Е.А. и др. "Примитивный" вариант бластного криза хронического миелолейкоза // Тер. архив. – 1995. – Т. 67, № 7. – С. 22–5.

13. Фролова Е.А., Френкель М.А., Лебедева Н.Б. и др. Моноклональные антитела ICO-115 к антигену CD34 человека // Вестник ОНЦ РАМН. – 1994. – Прил. – С. 10–2.
14. Al-Haij M., Wicha S.M., Benito-Hernandez A. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – 100. – P. 3983–8.
15. Eding C.E., Hallberg B. C-Kit hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase // Int J Biochem Cell Biol. – 2007. – 39. – P. 1995–8.
16. Baryshnikov A.Y., Zabolina T.N., Sedyachina N.P. et al. Coexpression of antigens CD34 specific for early hematopoietic precursors and CD95 (Fas/APO-1) mediating apoptosis // Experimental oncology. – 1994. – 16. – С. 343.
17. Bonnet D., Dick J.E. Human acute myeloid leukemia is a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell // Nat Med. – 1997. – 3 – P. 730–7.
18. Kronick M.N., Grossman P.D. Immunoassay techniques with fluorescent phycobiliprotein conjugates // Clinical chemistry. – 1983. – 29. – P. 1582–6.
19. Instructions for AnaTag R-Phycoerythrin Protein Labeling Kit. <http://www.anaspec.com/pdfs/72113.pdf>
20. La Porta C. Cancer stem cells: lessons from melanoma // Stem Cell Rev. – 2009. – 5(1). – P. 61–5.
21. Oi V.T., Glazer A.N., Stryer L. Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells and molecules // Journal of Cell Biology. – 1982. – 93. – P. 981–6.
22. Schatton T., Schutte U., Frank N.Y. et al. Modulation of T-cell activation by malignant melanoma initiating cells // Cancer Res. – 2010. – P. 697–798.
23. Turkina A.G., Baryshnikov A.Y., Sedyachina N.P. et al. Studies of P-glycoprotein in chronic myelogenous-leukaemia patients: Expression, activity and correlations with CD34 antigen // British Journal of Haematology. – 1996. – 92. – P. 88–96.
24. Turkina A.G., Zabolina T.N., Kusnetsov S.V. et al. Studies of some mechanisms of drug resistance in chronic myeloid leukemia (CML) // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 1999. – 457. – P. 477–88.