

УДК 616-097:616-006-018:576.3.017.22:616-006.81:616-076.5

О.С. Бурова, Н.В. Голубцова, М.А. Барышников, М.В. Оборотова, Л.Ф. Морозова, К.А. Барышников, А.Е. Бармашов, В.И. Карасева, А.Н. Иншаков, А.С. Гриневич, И.М. Лученко, П.К. Иванов, А.Ю. Барышников

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА ICO-401 ПРОТИВ АНТИГЕНА CD133

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Контактная информация

Бурова Ольга Семеновна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДнТО

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

e-mail: burova-55@mail.ru

Статья поступила 20.05.2015, принята к печати 10.08.2015.

Резюме

Получены МКА против антигена CD133 – маркера стволовых опухолевых клеток человека. Штамм ICO-401 получали путем слияния клеток мышинной миеломы NS-1 с клетками селезенки мышей линии BALB/C, предварительно трехкратно иммунизированных с интервалом в две недели клетками меланомы кожи человека линии mel IbrEE34RMCR. Слияние проведено при помощи р-ра ПЭГ ПЭГ/ДМСО. Для скрининга полученных МКА ICO-401 использовали клеточные линии меланомы человека из коллекции ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», различающиеся экспрессией антигена CD133. Экспрессию антигена оценивали в РИФ на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto™II. МКА ICO-401 сравнивали с коммерческими МКА против антигена CD133, показано, что оба антитела распознают один и тот же антиген, но связываются с разными эпитопами.

Ключевые слова: моноклональные антитела, CD133, стволовые опухолевые клетки, меланома кожи человека, проточная цитометрия.

O.S. Burova, N.V. Golubtsova, M.A. Baryshnikov, M.V. Oborotova, L.F. Morozova, K.A. Baryshnikov, A.E. Barmashov, V.I. Karaseva, A.N. Inshakov, A.S. Grinevich, I.M. Luchenko, P.K. Ivanov, A.Yu. Baryshnikov

MONOCLONAL ANTIBODIES ICO-401 AGAINST CD133 ANTIGEN

FSBI «N.N. Blokhin RCRC», Moscow

Abstract

Monoclonal antibody (mAb) against CD133 antigen is a stem marker of human tumor cells. Strain ICO-401 was prepared by cell fusion of murine myeloma NS-1 cells with splenocytes of BALB/ C mice, pre-immunized three times with an interval of two weeks with the cells of human melanoma mel IbrEE34RMCR. Merging was conducted with solution PEG/DMSO. Screening of mAb ICO-401 was performed on human melanoma cell lines from FSBI «N.N. Blokhin RCRC» collection which differ in the expression of CD133 antigen. Antigen expression was evaluated in immunofluorescence reaction by flow cytometer BD FACSCanto™II. ICO-401 was compared with commercial mAb against CD133 antigen. The results indicated that both mAb recognize the same antigen, but bind to different epitops.

Key words: monoclonal antibodies, CD133, tumor stem cells, human skin melanoma, flow cytometry.

Введение

В каждом новообразовании присутствует небольшая популяция клеток, называемых стволовыми, способных инициировать опухоль [3; 6]. Эти клетки обладают способностью к самовоспроизведению и формированию дифференцированных опухолевых клеток [5]. Первоначально СКО были обнаружены при ОМЛ и ХМЛ [8; 11; 13; 15; 27; 28], а в последующем идентифицированы при многих злокачественных заболеваниях. Маркеры для СК разных нозологий различны. Так, для мезенхимальной ткани характерно наличие CD13, CD29/ITGB1, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106/VCAM-1 и отсутствие типичных гематопозитических поверхност-

ных белков CD31/PECAM-1, CD45/LCA и CD116. Для рака молочной железы, рака желудка, рака яичников, рака простаты, рака органов головы и шеи, меланомы характерно наличие CD44 на СКО [2; 12; 21; 22; 26; 30]. Кроме того, для СК рака молочной железы отмечено отсутствие общего для эпителиальных тканей поверхностного маркера CD24 [16]. Иммунофенотип СК глиобластомы – CD133+/CD15+ [23; 25]; рака толстой кишки – CD133+/LR5+ [20; 29]; рака печени – CD24+/CD133+ [19]; рака легкого – CD133+/ALDH1+ [14; 18].

Антиген CD133 (PROM1) является промембран-1, который относится к молекулам адгезии [4]. Антиген CD133 – поверхностный гликопротеин, состоящий из пяти трансмембранных доменов.

Впервые он был идентифицирован как маркер гемопоэтической и нейронной СК. Антиген CD133 присутствует на нормальной СК и СКО многих солидных опухолей [14; 18–20; 22–25; 29]. Введение CD133⁺ клеток медуллобластомы иммунодефицитным мышам приводило к развитию опухоли, экспрессирующей антиген CD133. EGF и VEGF стимулировали увеличение CD133⁺-клеток в культуре, а также усиливали экспрессию MMP. Это приводило к более быстрому росту клеток у безтиминовых мышей. Помимо MMP, на активность СКО влияет экспрессия молекул адгезии L-ICAM (CD171), которые определяют на CD133⁺-клетках. Подавление молекул адгезии приводит к апоптозу и ингибированию роста опухоли. Гипоксия увеличивала количество CD133⁺-клеток [17]. В CD133⁺ опухолях гиперэкспрессирован Р-гикопротеин, продукт гена *MLU/MDR1*. Большинство авторов указывают на различное содержание CD133⁺-клеток в одной и той же опухоли.

Наиболее пригодными для характеристики и выделения клеток являются моноклональные антитела [1]. **Цель настоящей работы** – получение и характеристика МКА против антигена CD133.

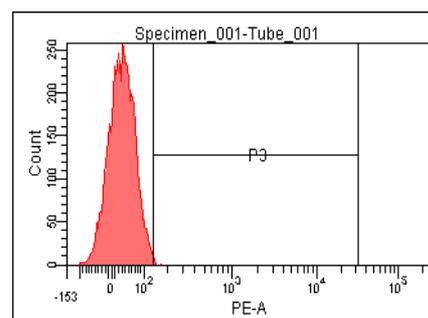
Материалы и методы

МКА против антигена CD133 ICO-401 получали путем слияния клеток мышинной миеломы NS-1 с клетками селезенки мышей линии BALB/C, предварительно трехкратно иммунизированных с интервалом в две недели клетками меланомы кожи человека линии mel IbrEE34RMCR [10]. Слияние проведено при помощи раствора ПЭГ ПЭГ/DMCO («Sigma»). Одну из гибридом, супернатант которой выявлял около 70–80 % АГ⁺ клеток, дважды клонировали методом лимитирующих разведений. Очистку и метку антител проводили по методике, описанной Голубцовой Н.В. и др. [7].

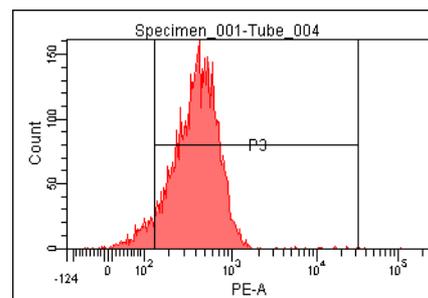
Для скрининга полученных МКА ICO-401 в реакции иммунофлуоресценции использовались клеточные линии меланомы человека, различающиеся экспрессией антигена CD133, из коллекции ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» [9]. Эксперименты по изучению специфичности полученных антител повторяли не менее трех раз.

Результаты и обсуждение

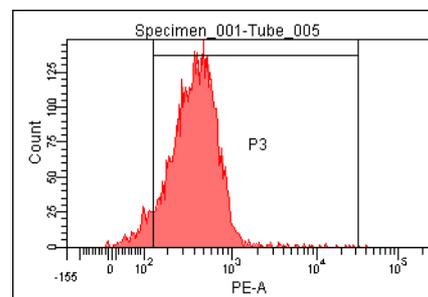
Тестирование полученных МКА ICO-401 на клеточной линии mel IbrEE34RMCR выявило 80 % антиген-положительных клеток. В качестве положительного контроля для CD133 использовали МКА CD133/2 (293C3)-PE («MACS Miltenyi Biotec», Германия), которые также реагировали с 80 % клеток линии mel IbrEE34RMCR. Гистограммы распределения клеток, окрашенных МКА ICO-401-PE, и CD133/2 (293C3)-PE представлены на рис. 1. Сходство профилей флуоресценции МКА ICO-401-PE и CD133/2 (293C3)-PE позволило предположить, что эти антитела распознают один и тот же антиген (рис. 1, Б-В).



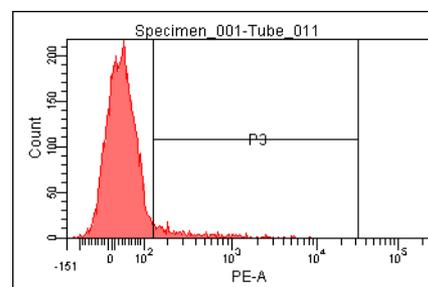
А



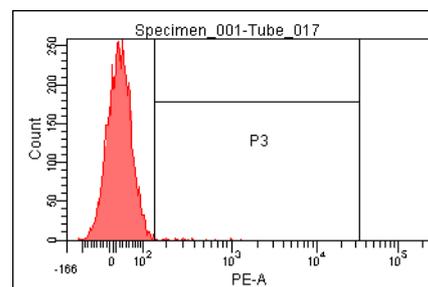
Б



В



Г



Д

Рис. 1. Гистограммы распределения клеток mel IbrEE34RMCR:

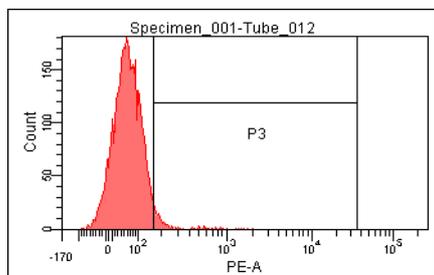
- А – контроль (неокрашенные клетки);
- Б – клетки, окрашенные МКА CD133/2 (293C3)-PE;
- В – клетки, окрашенные МКА ICO-401PE;
- Г – клетки, инкубированные с насыщающей концентрацией МКА ICO-401 и проявленные МКА CD133/2 (293C3)-PE;
- Д – клетки, инкубированные с насыщающей концентрацией МКА ICO-401 и проявленные МКА ICO-401-PE.

Для изучения специфичности МКА ICO-401 использовали метод конкурентного ингибирования. Клетки линии mel IbrEE34RMCR первоначально инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с избытком немеченых МКА ICO-401, после чего инкубировали с МКА ICO-401-PE или CD133/2 (293C3)-PE. В результате инкубация клеток mel IbrEE34RMCR с насыщающей концентрацией МКА ICO-401 приводила к почти полной блокаде связывания с этими клетками CD133/2 (293C3)-PE (5 % клеток связывались с антителами) и ICO-401 PE (1,7 % клеток связывались с антителами; рис. 1, Г, Д).

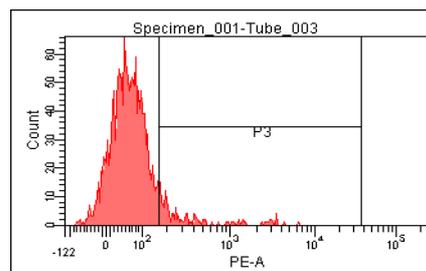
Для дальнейшей характеристики МКА ICO-401 был использован метод антигенной модуляции. Преинкубация клеток mel IbrEE34RMCR с МКА ICO-401 при температуре +37 °С приводила к снижению на клеточной поверхности антигена CD133, выявляемого МКА ICO-401-PE до 4,4 % после 3 ч инкубации и до 7,1 % после 20 ч. Тогда как при использовании МКА CD133/2 (293C3)-PE после 3 ч инкубации выявляли 80 % CD133, а после 20 ч инкубации – 21 % (рис. 2). Эти результаты свидетельствуют: МКА ICO-401 и МКА CD133/2PE реагируют с разными эпитопами молекулы CD133.

Заключение

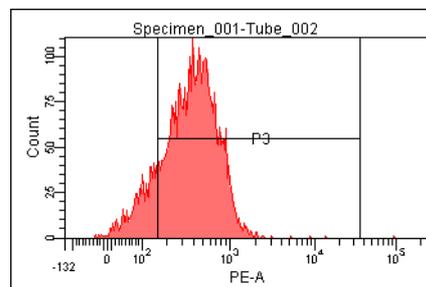
Получены и охарактеризованы антитела к CD133 ICO-401. Показано, что полученные антитела реагируют с антигеном CD133 так же, как и коммерческие антитела CD133/2 (293C3)-PE. Однако при использовании метода антигенной модуляции показано, что ICO-401-PE и CD133/2 (293C3)-PE распознают разные эпитопы молекулы CD133.



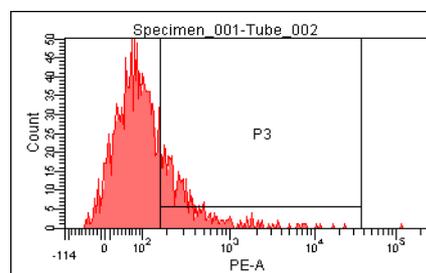
А



Б



В



Г

Рис. 2. Модуляция антигена CD133:

А – клетки, инкубированные с насыщающей концентрацией МКА ICO-401 в течение 3 ч при +37 °С и проявленные МКА ICO-401-PE;
 Б – клетки, инкубированные с насыщающей концентрацией МКА ICO-401 в течение 20 ч при +37 °С и проявленные МКА ICO-401-PE;
 Г – клетки, инкубированные с насыщающей концентрацией МКА ICO-401 в течение 3 ч при +37 °С и проявленные МКА CD133/2 (293C3)-PE;
 Д – клетки, инкубированные с насыщающей концентрацией МКА ICO-401 в течение 20 часов при +37 °С и проявленные МКА CD133/2 (293C3)-PE (21%).

Литература

1. Барышников А.Ю. Моноклональные антитела серии ИКО к дифференцировочным антигенам лимфоцитов человека // Гематология и трансфузиология. – 1990. – №8. – С. 4.
2. Барышников А.Ю., Голубцова Н.В., Бузова О.С. и др. Экспрессия антигена CD44 у больных метастатической меланомой кожи // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – № 4. – С. 17–20.
3. Барышников К.А., Оборотова М.В., Барышников А.Ю. Экспрессия маркеров стволовой опухолевой клетки при злокачественных новообразованиях // Вестник «РОИЦ им. Н.Н. Блохина». – 2015. – Т.26 (дополн.). – С. 3–8.
4. Боценовский В.А., Барышников А.Ю. Молекулы клеточной адгезии // Успехи современной биологии. – 1994. – Т. 114, № 6. – С. 741.
5. 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.
6. Вартанян А.А., Оборотова М.В. Основные детерминанты стволовой клетки меланомы // Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т. 14, № 2. – С. 7–16.

7. Голубцова Н.В., Бурова О.С., Барышников К.А. и др. Моноклональные антитела ICO-401 против антигена CD133 // Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т. 14, № 2. – С. 99–104.
8. Кадагидзе З.Г., Тупицын Н.Н., Заботина Т.Н. и др. Иммунофенотипические и функциональные особенности стволовых клеток лейкозов // Российский онкологический журнал. – 1996. – № 1. – С. 43–8.
9. 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. 7–11.
10. Сураева Н.М., Морозова Л.Ф., Самойлов А.В. и др. Изменение морфологических и иммунологических характеристик клеток меланомной линии (Mel Ibr) в результате воздействия куриного эмбрионального экстракта // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 159, № 4. – С. 521–4.
11. Туркина А.Г., Моисеенкова И.Н., Фролова Е.А. и др. «Примитивный» вариант бластного криза хронического миелолейкоза // Тер. архив. – 1995. – Т. 67, № 7. – С. 22–5.
12. Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells // Proc Natl Acad Sci USA. – 2003. – 100. – P. 3983–8.
13. 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. – P. 343.
14. Bertolini G., Roz L., Perego P. et al. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment // Proc Natl Acad Sci USA. – 2009. – 106. – P. 16281–6.
15. 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.
16. Bruttel V.S., Wischhusen J. Cancer stem cell immunology: key to understanding tumorigenesis and tumor immune escape? // Front Immunol. – 2014. – 5. – P. 360.
17. Griguer C.E., Oliva C.R., Gobin E. et al. CD133 is a marker of bioenergetic stress in human glioma // PLoS One. – 2008. – 3(11). – P. 3655–61.
18. Jiang F., Qiu Q., Khanna A. et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer // Mol Cancer Res. – 2009. – 7. – P. 330–8.
19. Lee T.K., Castilho A., Cheung V.C. et al. CD24(+) liver tumor-initiating cells drive self-renewal and tumor initiation through STAT3-mediated NANOG regulation // Cell Stem Cell. – 2011. – 9. – P. 50–63.
20. O'Brien C.A., Pollett A., Gallinger S., Dick J.E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice // Nature. – 2007. – 445. – P. 106–10.
21. Patrawala L., Calhoun T., Schneider-Broussard R. et al. Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells // Oncogene. – 2006. – 25. – P. 1696–708.
22. Prince M.E., Sivanandan R., Kaczorowski A. et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma // Proc Natl Acad Sci USA. – 2007. – 104. – P. 973–8.
23. Read T.A., Fogarty M.P., Markant S.L. et al. Identification of CD15 as a marker for tumor-propagating cells in a mouse model of medulloblastoma // Cancer Cell. – 2009. – 15. – P. 135–47.
24. Shmelkov S.V., Butler J.M., Hooper A.T. et al. CD133 expression is not restricted to stem cells/ and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumours // J Clin Invest. – 2008. – 118. – P. 2111–20.
25. Singh S.K., Clarke I.D., Terasaki M. et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors // Cancer Res. – 2003. – 63. – P. 5821–8.
26. Takaishi S., Okumura T., Tu S. et al. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44 // Stem Cells. – 2009. – 27. – P. 1006–20.
27. 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.
28. 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.
29. Vermeulen L., Todaro M., de Sousa Mello F. et al. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multilineage differentiation capacity // Proc Natl Acad Sci USA. – 2008. – 105. – P. 13427–32.
30. Zhang S., Balch C., Chan M.W. et al. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors // Cancer Res. – 2008. – 68. – P. 4311–20.