

31. Mehrishi J. N. Molecular aspects of the mammalian cell surface.— *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 1972, 25, p. 1—70.
32. Mond J. J., Mongini P. K. A., Sieckmann D., Paul W. E. Role of T-lymphocytes in the response to TNP-AESM-Ficoll.— *J. Immunol.*, 1980, 125, N 3, p. 1066—1070.
33. Nossal G. J. V., Pike B. L. Antibody receptor diversity and diversity of signals.— In: *Immunology 80*. New York: Acad. Press, 1980, p. 136—152.
34. Pure E., Vitetta E. The murine B cell response to TNP-polyacrylamide beads: the relationship between the epitope density of the antigen and the requirements for T cell help and surface IgD.— *J. Immunol.*, 1980, 125, N 1, p. 420—427.
35. Rosenthal A. S., Thomas J. W., Schroer J., Blake J. T. The role of macrophages in genetic control of the immune response.— In: *Immunology 80*. New York: Acad. Press, 1980, p. 458—477.
36. Schechter I., Schechter B., Sela M. Combining sites of antibodies with L-alanine and D-alanine peptide specificity and the effect of serum proteolytic activity on their activation.— *Biochim. and biophys. acta*, 1966, 127, p. 438—456.
37. Sela M. Antigenicity: some molecular aspects.— *Science*, 1969, 166, N 12, p. 1365—1374.
38. Shortman K., Howard M. C., Baker J. Antigen-initiated B-lymphocyte differentiation. XIV. Non specific effects of antigen stimulation cause proliferation in «pre-progenitor» subset at primary B cells.— *J. Immunol.*, 1978, 121, p. 2060—2065.
39. Singh B., Lec K. C., Fraga E. W. et al. Minimum peptide sequences necessary for priming and triggering of humoral and cell-mediated immune responses in mice: use of synthetic peptide antigens of defined structure.— *J. Immunol.*, 1980, 124, N 3, p. 1336—1343.
40. Steinman R. M., Witmer M. D. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1978, 75, N 10, p. 5132—5136.
41. Stingl G., Katz S. J., Clement L. et al. Immunologic functions of Ia-bearing epidermal Langerhans cells.— *J. Immunol.*, 1978, 121, N 5, p. 2005—2013.
42. Tadakuma T., Yasuda T., Kinsky S. C., Pieree C. W. The effect of epitope density on the in vitro immunogenicity of hapten-sensitized liposomal model membranes.— *J. Immunol.*, 1980, 124, N 5, p. 2175—2179.
43. Uhr J., Vitetta E. S. Receptor-mediator triggering and tolerance in murine B-cell.— In: *Cells of immunoglobulin synthesis*. New York: Acad. Press, 1979, p. 155—163.
44. Ward R., Köhler H. Regulation of clones responding to dextran B 1355 S. II. Response of T-dependent and T-independent precursors.— *J. Immunology*, 1981, 126, N 1, p. 146—149.
45. Wigzell H., Binz H. Lymphocyte receptors.— In: *Immunology 80*. London; New York: Acad. Press, 1980, p. 94—104.

Институт иммунологии
АМН СССР

Поступила в редакцию
9.II 1982 г.

УДК 577.27

С. В. Комиссаренко

ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ И ПРИМЕНЕНИЕ МОНОСПЕЦИФИЧЕСКИХ И МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ В ИММУНОХИМИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

Успехи, достигнутые за последние годы в области современной иммунологии, во многом обязаны широкому использованию в качестве экспериментальных моделей культур клеточных линий иммунокомпетентных клеток. Клонирование и селекция лимфоцитов привели к получению однородных клеточных популяций, синтезирующих и/или секретирующих достаточно узкий набор биологически активных веществ. Такие клетки обладают уникальными для этой популяции эффекторными свойствами и имеют характерный набор антигенов на поверхностной мембране. Это позволило накапливать и анализировать молекулярнобиологическими и биохимическими методами макромолекулы этих клеточных линий: изучать организацию структурных генов, растворимые факторы межклеточного взаимодействия (лимфокины, монокины, интерферон и др.), определять структуру антигенов плазматической мембраны лимфоцитов.

Если культивирование трансформированных клеток животных проводится несколько десятилетий и является тривиальным, то выращивание линий нормальных (не

опухолевых) клеток стало возможным лишь последние 5—7 лет после открытия ростовых факторов, поддерживающих рост (размножение и дифференциацию) клеточных клонов [34]. Все больший интерес вызывает и все шире применяется в исследованиях новая биотехнология культивирования и использования клеточных линий, связанная с получением гибридом — линий гибридов между опухолевыми клетками и соматическими клетками-продуцентами биологически активных веществ. Получаемые при гибридизации гетерокарконы синтезируют соответствующее эффекторное вещество и обладают «бессмертием» опухолевых клеток. Такие клетки можно практически неограниченно культивировать *in vitro* и *in vivo* или хранить в замороженном виде. Сейчас во многих странах в банках клеточных линий и в лабораториях имеются тысячи линий гибридом, обладающих уникальными биологическими свойствами.

Одним из самых распространенных видов гибридом являются гибридомы В лимфоцитов животных, которые используются для получения так называемых моноклональных антител [13, 20].

В соответствии с клонально-селекционной теорией иммунитета, единичные плазматические клетки — потомки В лимфоцита могут, каждая, синтезировать и секретировать антитела лишь одной специфичности. Однако при иммунизации животных даже высокоочищенным антигеном обычно получают широкий набор специфичностей антител. Это связано с тем, что: 1) антигены, как правило, имеют несколько различающихся антигенных детерминант; 2) антитела даже одной специфичности, т. е. против одной антигенной детерминанты, отличаются друг от друга физико-химическими, антигенными свойствами, сродством к антигену, так как они образуются клонами-потомками разных клеток. Бывают случаи, когда какой-либо лимфоцит подвергается злокачественной трансформации и дает начало росту клона клеток, синтезирующих идентичные моноклональные антитела, которые гомогенны и моносpezifичны.

В эксперименте моноклональные антитела можно получить, гибридизируя антителообразующие клетки (например, лимфоциты селезенки после иммунизации животного) с миеломными клетками (трансформированными В лимфоцитами), образуя В гибридомы.

В этой статье невозможно достаточно полно осветить широкие возможности применения гибридом или подробно остановиться на свойствах синтезируемых гибридомными клетками продуктов. Поэтому будет приведена лишь схема получения гибридом В клеток и описаны некоторые подходы к использованию моноклональных и моносpezifических антител в иммунохимическом анализе.

Гибридизация лимфоцитов с миеломными клетками и селекция гибридом. В качестве источника миеломных клеток для гибридизации обычно используют мышинные клеточные линии, происходящие из миеломы МОРС-21, секретирующей IgG₁ молекулы с легкой цепью и перевиваемой на мышах линии BALB/C. Из этой миеломы были получены клоны нечувствительные к азагуанину (дефектные по ферменту гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазе) и несекретирующие иммуноглобулинов: P3-NS1-Ag4-1; x63—Ag—8.653 и Sp2/0—Ag—14. Эти линии чаще всего используются для гибридизации, так как они обладают следующими необходимыми свойствами: 1) хорошо гибридизируются и растут после гибридизации; 2) полностью погибают в среде НАТ, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин (аминоптерин блокирует биосинтез пуринов *de novo* в этих клетках, а гипоксантин и тимидин не могут использоваться для альтернативного пути биосинтеза, так как миеломные клетки этих линий не содержат ферментов тимидинкиназы и гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы); 3) не секретируют собственных иммуноглобулинов или их цепей (NS-1 может секретировать с цепи после гибридизации). К сожалению, пока отсутствуют миеломы других видов животных и человека, пригодные для получения В гибридом (кроме крысиной миеломы 210-RCY3—Ag1). Для гибридизации берут клетки миеломы в фазе экспоненциального роста.

Источником иммунных лимфоцитов могут быть мыши, крысы, кролики (гибриды клеток мышь — кролик растут плохо), животные других видов, а также человека. Однако чаще всего берут селезенку мышей BALB/C, так как это позволяет последующую трансплантацию образующихся гибридом сингенным животным. Если для иммунизации используют мышей других линий (например, А), то гибридомы перевивают соответствующим гибридам первого поколения (BALB/C×А)_{F1}. Для гибридизации желательно брать лимфоциты на 2—3 дня раньше пика антителообразования. В качестве

гибридирующего агента сейчас с молекулярным весом от 500 до

Для слияния клеток смешанного животного в соотношении раствор полиэтиленгликоля. Клеточной средой, а затем центрифугируют гибриды, используя этиленгликоля. Мы применяли токсичные для гибридных клеток значительному снижению часто

Точные механизмы гибридомы этиленгликоля происходит слияние гибридуемых клеток и образование идет лучше в активном, одно ядро с хромосомами из этих хромосом иногда уравнивании. Дальнейшая работа гибридных клеток.

При гибридизации образуются гибриды с лимфоцитами, гибриды и смесь исходных клеток. Мы смешиваем клетки, кодирующие бозилтрансферазы или в клетках с НАТ. Также погибают и в среде с НАТ через 8—10 дней необходимо выделить клоны

Гибридные клетки в свежую среду НАТ около 10% новую культуральную среду крайней мере дважды меняю

Для поиска специфичности культуральную среду, примеси гена и возможностей исследования количества клонов, то метод является и специфичным определений. Обычно для определения антигенов были клетки и метод. Принцип метода заключается, используемой для анализа неспецифической сорбции носителем (часто используют держат общих антигенов отмывания этого носителя). Домашних культуральных сред на стенках посуды антигенный комплекс можно вымыть из иммунных клеток. В первом случае метод называется определяется по активности дофазным радиоиммунологическим считают в счетчике или с помощью из хрена, щелочную иногда применяют флуоресцентный А стафилококка, который А также должен содержать флуорохромную. Для поиска мембраны клеток вместо истинный тест [18], а также

гибридирующего агента сейчас почти исключительно пользуются полиэтиленгликолем с молекулярным весом от 500 до 4000.

Для слияния клеток смешивают миеломные клетки с лимфоцитами иммунизированного животного в соотношениях от 1:1 до 1:10 и добавляют при 37 °C 35—50 % раствор полиэтиленгликоля. Клетки перемешивают и через 1 мин разбавляют питательной средой, а затем центрифугируют 400 g 7 мин. Разные авторы по-разному проводят гибридизацию, используя различные концентрации и молекулярные массы полиэтиленгликоля. Мы применяли 50 % полиэтиленгликоль, так как большие концентрации токсичны для гибридных клеток, а уменьшение концентрации ниже 30 % приводит к значительному снижению частоты образования гибридов [13].

Точные механизмы гибридизации неизвестны. Очевидно, что под действием полиэтиленгликоля происходит слипание, а затем и слияние плазматических мембран гибризируемых клеток и образование одной, содержащей два или больше ядер. Этот процесс идет лучше в активированных клетках. После митоза гибридная клетка имеет одно ядро с хромосомами клеток, которые были выбраны для гибридизации. Часть из этих хромосом иногда утрачивается при гибридизации или последующем клонировании. Дальнейшая работа заключается в селекции и клонировании полученных гибридных клеток.

При гибридизации образуются клетки следующих типов: гибриды миеломных клеток с лимфоцитами, гибриды миеломы — миеломы, гибриды лимфоцит — лимфоцит и смесь исходных клеток. Миеломные клетки и гибриды, не содержащие генов нормальных клеток, кодирующих синтез тимидинкиназы или гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы или в которых нарушена экспрессия этих генов, погибают в среде с НАТ. Также погибают из-за ограниченного срока жизни лимфоциты. Поэтому в среде с НАТ через 8—10 дней остаются лишь гибриды миеломы — лимфоцит, из которых необходимо выделить клоны, синтезирующие антитела нужной активности.

Гибридные клетки в планшетах «подкармливают» каждую неделю, заменяя на свежую среду НАТ около половины среды в ячейке планшета. До перехода на обычную культуральную среду клеткам, секретирующим моноклональные антитела, по крайней мере дважды меняют среду НАТ.

Для поиска специфичности антител, секретируемых гибридными клетками в культуральную среду, применяют различные методы, выбор которых зависит от антигена и возможностей исследователя. Так как обычно надо анализировать большое количество клонов, то метод анализа должен быть достаточно простым, надежным (чувствительным и специфичным), быстрым и позволяющим одновременно проводить много определений. Обычно для растворимых антигенов, но иногда и для тех случаев, когда антигенами были клетки или субклеточные фракции, применяют иммуносорбционный метод. Принцип метода заключается в пассивной сорбции антигена на стенках посуды, используемой для анализа. Несвязавшийся антиген отмывают, а остающиеся места неспецифической сорбции на посуде «забивают» инкубацией с неспецифическим носителем (часто используют бычий сывороточный альбумин), который не должен содержать общих антигенных детерминант с антигеном и иммуноглобулинами. После отмывания этого носителя в пробы вносят стерильно отобранные супернатанты гибридных культуральных сред. Если таковые содержат антитела против сорбированного на стенках посуды антигена, то происходит связывание антител с антигеном. Образовавшийся комплекс можно выявить с помощью других антител, направленных против мышиных иммуноглобулинов и конъюгированных с ферментами или меченных ^{125}I . В первом случае метод называется ферментиммуносорбционным методом, и наличие антител определяется по активности соответствующего фермента [7], во втором — твердофазным радиоиммунологическим анализом, при котором каждую ячейку с антигеном считают в счетчике или делают автордиограмму. В качестве фермента, ковалентно связанного с антииммуноглобулиновыми антителами, чаще всего используют пероксидазу из хрена, щелочную фосфатазу и β -галактозидазу. Вместо фермента или изотопа иногда применяют флуорохромы, а вместо антииммуноглобулиновых антител — белок А стафилококка, который имеет сродство к Fc фрагменту IgG антител [9, 24]. Белок А также должен содержать метку — или ферментативную, или радиоактивную, или флуорохромную. Для поиска моноклональных антител против антигенов поверхностной мембраны клеток вместо иммуносорбционного метода часто используют микроцитотоксический тест [18], а также гемагглютинацию, бляшкообразование и др. методы.

Взаимодействие антитела с антигеном количественно описывается как: 1) $AG + \pm AT \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} AG \cdot AT$; 2) $\frac{k_1}{k_2} = K$; 3) $[AG \cdot AT] = K \cdot [AG] \cdot [AT]$, где: k_1 и k_2 — константы скоростей соответственно прямой и обратной реакции, K — константа равновесия, определяющая сродство антитела к антигену, а $[AG]$, $[AT]$ и $[AG \cdot AT]$ — концентрации соответственно свободного антигена, свободного антитела и комплекса антиген — антитело.

В связи с этим концентрация комплекса антиген — антитело прямопропорциональна концентрации антител в растворе и сродству антител к антигену. Так как K моноклональных антител превышает K обычных антител на 4—5 порядков, то и количество моноклональных антител, используемых для анализа, может быть уменьшено в 10^4 — 10^5 раз по сравнению с количеством обычных антител.

Однако главное достоинство антител с высоким сродством заключается не столько в их «экономии» при проведении иммунохимического анализа, сколько в значительном увеличении чувствительности системы. Более того, количественное определение веществ, находящихся в растворе в концентрации 10^{-9} — 10^{-11} моль/л (именно такая концентрация многих белковых гормонов в сыворотке крови), вообще невозможно радиоиммунологически, если K антител ниже 10^8 — 10^9 л/моль [35, 38]. Обычно считают, что исследуемое вещество можно количественно определять, если его концентрация не ниже $1/K$.

К достоинствам моноклональных антител, помимо высокой специфичности, относится также то, что их можно получать против неочищенных антигенов, или таковых в микрограммовых количествах. В качестве недостатков или трудностей технологии получения моноклональных антител можно назвать необходимость клонирования гибридом, при котором используется большое количество высококачественных питательных сред и пластиковой посуды. Нужно помнить также о том, что моноклональные антитела часто не дают преципитации с соответствующими антигенами (это обычно бывает, когда антиген не содержит повторяющихся одинаковых антигенных детерминант), и порой лишь смешивание трех-четырех моноклональных антител различных специфичностей против антигенных детерминант того же антигена приводит к образованию преципитата.

Чаще всего моноклональные и моноспецифические антитела применяют в следующих случаях:

— для цитотоксического действия. С помощью моноклональных или моноспецифических антител можно в присутствии комплемента избирательно лизировать определенные субпопуляции клеток, иммунокомпетентных в том числе, которые экспрессируют на своей поверхности соответствующие антигены. Мы использовали моноклональные антитела против Thy 1,2 антигена мыши для лизиса Thy 1,2 положительных спленоцитов с целью обогащения популяции B клеток. Иногда лизис проводят не с помощью комплемента, а конъюгируя антитела с токсинами или радиоактивными изотопами. Так, в Вистаровском институте в США группой Х. Копровского были получены моноклональные антитела против поверхностных антигенов, характерных для определенного вида опухоли — против т. н. опухолеспецифичных антигенов, или антигенов, ассоциированных с опухолью. В случае меланомы это были белковые антигены [17, 22], а в случае колоректальной карциномы — гликолипиды (моносиалоганглиозиды) [15, 16]. Конъюгируя моноклональные антитела с A цепью дифтерийного токсина или A цепью токсина рицинуса, авторы получали *in vitro* гибель 100 % клеток, имевших на своей поверхности соответствующий опухолевый антиген. Клетки без антигена не повреждались [12]. Очевидно, что антитела служили проводником токсинов к специфической клетке-мишени и, связываясь с антигеном на клетке, способствовали проникновению в нее токсинов, которые ингибируют процессы трансляции мРНК, инактивируя фактор 2 элонгации (A цепь дифтерийного токсина) или инактивируя 60 S субъединицу рибосом (A цепь токсина рицинуса).

Возможно, что с усовершенствованием методов конъюгации антител с антигеном, с получением моноклональных антител против большой гаммы опухолевых антигенов, а также с использованием факторов, облегчающих проникновение комплекса антитело — токсин в клетку, этот подход в скором времени позволит разрушать различные опухолевые клетки не только *in vitro*, но и в организме;

— в медицине для диагностики и лечения болезней. Используя стандартные иммунохимические методы, с помощью моноклональных или моноспецифических антител

можно определять локализацию опухоли в организме или появление циркулирующих антигенов в сыворотке крови. Это относится не только к опухолевым антигенам, но и любым другим биологически активным соединениям — гормонам, вирусным антигенам, различным метаболитам, лекарственным препаратам и т. п. Эти же антитела незаменимы для типирования антигенов, в частности антигенов тканевой совместимости, групп крови.

Моноклональные антитела, особенно полученные из гибридом клеток человека, в ближайшем будущем могут стать самыми совершенными лечебными иммунными сыворотками — высокоэффективными и свободными от побочных эффектов. Уже сейчас есть клоны клеток, секретирующих антитела, которые нейтрализуют или, напротив, усиливают действие некоторых вирусов, токсинов, вызывают лизис бактерий и простейших [30, 31].

Моноклональные антитела применяются также для моделирования и изучения механизмов развития многих аутоиммунных заболеваний. Так, например, с помощью моноклональных антител против отдельных субъединиц рецептора ацетилхолина было показано, что экспериментально вызванное аутоиммунное заболевание — миастения гравис — заболевание, причиной которого является образование аутоантител против ацетилхолинового рецептора, можно пассивно переносить другим животным с помощью антител против определенной антигенной детерминанты, локализованной на α субъединице рецептора [37]. Очень привлекательной кажется идея лечения аутоиммунных заболеваний, вызываемых образованием антител против антигенов собственных тканей, с помощью моноклональных антиидиотипических антител, т. е. антител, направленных против антигенных детерминант иммуноглобулинов, локализованных вблизи от активного центра других антител или непосредственно образованных антигенсвязывающим центром антител. В соответствии с гипотезой Иерне [19], регуляция иммунной системы осуществляется с помощью антиидиотипических антител, которые, связываясь с активными центрами антигенреактивных рецепторов лимфоцитов, регулируют процессы пролиферации и дифференциации иммунокомпетентных клеток. Поэтому введение животному определенного количества антиидиотипических антител может привести к торможению развития клона соответствующих лимфоцитов и прекращению синтеза этими лимфоцитами и их потомками антител, что было проверено экспериментально [32]. К сожалению, при экспериментальной миастении гравис развитие болезни не удалось купировать с помощью моноклональных антител против одного из идиотипов [8]. Неудача, возможно, связана с тем, что при болезни образуются антитела сразу против нескольких антигенных детерминант на рецепторе;

— в экспериментальной биологии и, в частности, в иммунологии. Это выделение в отдельную группу очень условно, так как остаются те же принципы применения моноклональных и моноспецифических антител, о которых уже говорилось выше. Поэтому в этом разделе будет приведено несколько наиболее характерных примеров использования таких антител для изучения структуры и функции макромолекул. Итак, моноспецифические и особенно моноклональные антитела произвели революцию в серологии. Они выявляют тонкие различия в структуре антигенов, находящихся в растворе, на поверхности или внутри клетки, позволяют их локализовать или количественно определять. Возможности количественного определения зависят от специфичности и сродства к соответствующему антигену, а также от чувствительности детектирующей системы. Так, применение ферритина или вирусов для маркирования антител позволяет выявлять единичные молекулы с помощью иммуноцитохимических методов, но их использование, как правило, ограничивается анализом антигенов поверхности клетки. Поэтому для улучшения проникновения антител с меткой в клетку применяют фрагменты антител, обладающие меньшей молекулярной массой, конъюгированные со сравнительно небольшим ферментом — пероксидазой из хрена [5]. Мы использовали конъюгат пероксидазы с Fав фрагментом моноспецифических антител против нейротоксина апамина и показали, что связывание токсина происходит как на поверхностной, так и на ядерной мембранах гладкомышечных клеток. Эти же моноспецифические антитела позволили установить, какие аминокислоты вносят наибольший вклад в формирование антигенной детерминанты нейротоксина [2].

Моноклональные антитела против субъединиц ацетилхолинового рецептора, о которых уже говорилось выше, были успешно применены для анализа организации и функционирования этого рецептора [8, 28, 37]. Из более чем 70 разных моноклональ-

ных антител были найдены антиформу рецептора, блокирующие с определенными пептидами мо-ти и частично локализовать общедельных субъединицах (α , β , γ и лональных антител можно инду-антитела можно крайне эффекти-частности, для выделения отдель-метод является наилучшим для-ной среды при их образовании-торых клонируются гены интерф-но-инженерными методами инсу-ток лимфокины, интерлейкин 2, и

Одной из самых важных с-иммуногенетика клеточной пове-брана лимфоцита представляет-против которых обычными мето-нее их разделить и проанализир-вотного, иммунизированного кл-ни был представлен на клеточ-клетка, синтезирующая антител-получить клон клеток-продуцен-ли получены моноклональные-субпопуляций лимфоцитов (или- Thy 1.1 ; Thy 1.2 ; Qa 4 , Qa 5 ,-многих других [14, 25, 27]. Ост-тел при анализе полиморфизма-совместимости — H-2 мыши и-чия в структуре и организаци-ционными серологическими мет-

Специальный интерес пре-ла против антигенных детерми-К. Раевский с соавторами [6, типичические моноклональные а-си-3-нитрофенилацетил-гаптена-регулирует у них синтез идис-ключение экспрессии генов, ко-цепей иммуноглобулинов, при

В связи с тем, что можн-ного» участка биологически-плементарны этому «эффектор-тив активного центра первы-вторых, т. е. антиидиотипиче-тождественны «эффекторному-типические антитела во многи-ней вместо эффекторных мо-тител — получения F_γ , $\text{F}_{\text{ав}}$, F (токсинов, лектинов и др.),-дающих отличающимися биол-браны, фиксацией комплемен-клональных антиидиотипичес-биологически активных веще-ровать с эффекторными моле-воположное этим молекулам

Несмотря на незначите-трудно переоценить ее значе-объем применения гибридо-открытий.

ных антител были найдены антитела, различающие нативную или денатурированную форму рецептора, блокирующие На канал или не влияющие на него, связывающиеся с определенными пептидами молекулы рецептора. Антитела позволили также найти и частично локализовать общее и различающиеся антигенные детерминанты на отдельных субъединицах (α , β , γ и δ) рецептора. В связи с тем, что образование моноклональных антител можно индуцировать неочищенными антигенами, полученные затем антитела можно крайне эффективно использовать для аффинной хроматографии и, в частности, для выделения отдельных антигенов из гетерогенной смеси. Уже сейчас этот метод является наилучшим для одноэтапного выделения интерферонов из культуральной среды при их образовании или клетками крови, или при синтезе в *E. Coli*, в которых клонируются гены интерферона [23]. Аналогично получают синтезируемые генно-инженерными методами инсулин, гормон роста или секретируемые культурами клеток лимфокины, интерлейкин 2, например.

Одной из самых важных областей применения моноклональных антител является иммуногенетика клеточной поверхности. Это связано с тем, что плазматическая мембрана лимфоцита представляет крайне сложный набор сотен отличающихся молекул, против которых обычными методами достаточно трудно получить антитела и еще труднее их разделить и проанализировать. При гибридизации же лимфоцитов селезенки животного, иммунизированного клеточными антигенами, как бы редко искомым антигеном был представлен на клеточной мембране, как правило всегда найдется гибридная клетка, синтезирующая антитела против этого антигена, что позволяет в последствии получить клон клеток-продуцентов соответствующих моноклональных антител. Так были получены моноклональные антитела против антигенов, характерных для различных субпопуляций лимфоцитов (или стадий дифференциации определенных субпопуляций), — Thy 1.1; Thy 1.2; Qa 4, Qa 5, T 1, Ly 1, Ly 2, Ly 3, ..., Ly 10, PC 1, PC 2 антигенов и многих других [14, 25, 27]. Особенно успешным было применение моноклональных антител при анализе полиморфизма продуктов генов главного комплекса антигенов тканевой совместимости — H-2 мыши и HLA человека [27, 36], которые выявили тонкие различия в структуре и организации этих антигенов, что было невозможно сделать традиционными серологическими методами.

Специальный интерес представляют моноклональные антиидиотипические антитела против антигенных детерминант, образованных активными центрами других антител. К. Раевский с соавторами [6, 32, 33], выделив гибридомы, секретирующие антиидиотипические моноклональные антитела против антител с активностью против NP (4-оксис-3-нитрофенилацетил-гаптена), показали, что введение животными антиидиотипа регулирует у них синтез идиотипических антител, а также продемонстрировали переключение экспрессии генов, кодирующих синтез разных константных участков тяжелых цепей иммуноглобулинов, при дифференциации гибридных клеток.

В связи с тем, что можно получить моноклональные антитела против «эффекторного» участка биологически активных веществ, которые будут конформационно комплементарны этому «эффекторному» участку, а также моноклональные антитела против активного центра первых антител, логично предположить, что активные центры вторых, т. е. антиидиотипических антител будут пространственно подобны или даже тождественны «эффекторному» участку антигена. Поэтому моноклональные антиидиотипические антитела во многих случаях будут связываться с рецепторами клеток-мишеней вместо эффекторных молекул. Учитывая возможность модификации молекул антител — получения F_v , F_{ab} , $F(ab)'_2$ фрагментов, присоединения к ним разных лигандов (токсина, лектина и др.), а также использования антител различных классов, обладающих отличающимися биологическими свойствами — переносом через плаценту, мембраны, фиксацией комплемента, можно представить возможность применения моноклональных антиидиотипических антител для модуляции фармакологического действия биологически активных веществ. Такие антиидиотипические антитела будут конкурировать с эффекторными молекулами за рецепторы и оказывать аналогичное или противоположное этим молекулам действие.

Несмотря на незначительный срок использования гибридной биотехнологии, трудно переоценить ее значение для иммунологии, и конечно же все расширяющийся объем применения гибридом и моноклональных антител служит гарантией новых открытий.

Список литературы

1. Комиссаренко С. В., Аврамеас С. Свойства иммуносорбентов, приготовленных путем связывания антигенов с активированным глутаровым альдегидом полиакриламидным гелем, BrCN-активированной агарозой и сополимеризацией антигенов глутаровым альдегидом.— Укр. биохим. журн., 1978, 50, № 4, с. 500—511.
2. (Комиссаренко С. В., Василенко С. В., Елякова Е. Г. и др.) Komisarenko S. V., Vasilenko S. V., Elyakova E. G., et al. Immunochemistry of apamin—bee venom neurotoxin. Radioimmunoassay with apamin and its derivatives.— Molec. Immunol., 1981, 18, N 6, p. 533—536.
3. Комиссаренко С. В., Скок М. В., Васильева Г. А. и др. Иммунохимический анализ цитохрома с лошади, стехиометрия взаимодействия и сродство цитохрома с к специфически F_{ab} фрагментам.— Докл. АН СССР, 1982, 264, № 3, с. 511—514.
4. Avrameas S., Ternynck T. The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunosorbents.— Immunochimistry, 1969, N 6, p. 53—66.
5. Avrameas S., Ternynck T. Peroxidase-labelled antibody and Fab-conjugates with enhanced intracellular penetration.— Immunochimistry, 1971, N 8, p. 1175—1179.
6. Beureuther K., Bovens J., Dildrop R. et al. Isolation and characterization of class switch variants of myeloma and hybridoma cells.— In: Immunoglobulin idiotypes and their expression. New York: Acad. press, 1981, p. 131—137.
7. Butler J. E., Feldbush T. L., McGovern P. L., Stewart N. The enzyme-linked immunosorbent assay: a measure of antibody concentration or affinity?— Immunochimistry, 1978, N 15, p. 131—136.
8. Conti-Tronconi B., Tzartos S., Lindstrom J. Monoclonal antibodies as probes of acetylcholine receptor structure. 2: Binding to native receptor.— Biochemistry, 1981, 20, N 8, p. 2181—2191.
9. Dubois-Dalcq M., McFarland H., McFarlin D. Protein A-peroxidase: a valuable tool for the localization of antigens.— J. Histochem. Cytochem., 1977, N 25, p. 1201—1206.
10. Ey P. L., Prowse S. J., Jenkin C. R. Isolation of pure IgG₁, IgG_{2a} and IgG_{2b} immunoglobulins from serum using protein A-Sepharose.— Immunochimistry, 1978, N 15, p. 429—436.
11. Gee A. P., Langone J. J. Immunoassay using ¹²⁵I or enzyme-labelled protein A and antigen-coated tubes.— Anal. Biochem., 1981, 116, N 2, p. 524—531.
12. Gilliland D. G., Steplewski Z., Collier R. J. et al. Antibody-directed cytotoxic agents: use of monoclonal antibody to direct the action of toxin A chains to colorectal carcinoma cells.— Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, 77, N 8, p. 4539—4543.
13. Goding J. W. Antibody production by hybridomas.— J. Immunol. Methods, 1980, 39, N 4, p. 285—308.
14. Hadden J. W. Hybridoma antibodies.— Clin. Bull., 1980, 10, N 1, p. 26—29.
15. Herlyn M., Steplewski Z., Herlyn D., Koprowski H. Inhibition of growth of colorectal carcinoma in nude mice by monoclonal antibodies.— Cancer Res., 1980, 40, p. 717—721.
16. Herlyn D., Steplewski Z., Herlyn M., Koprowski H. Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies.— Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, N 3, p. 1438—1442.
17. Herlyn M., Clark W. H., Mastrangelo M. J. et al. Specific immunoreactivity of hybridoma-secreted monoclonal anti-melanoma antibodies to cultured cells and freshly derived human cells.— Cancer Res., 1980, 40, p. 3602—3609.
18. Hudson L., Hay F. C. Practical Immunology.— Oxford: Blackwell, 1976.— 298 p.
19. Jerne N. K. Towards a network theory of the immune system.— Ann. immunol. (Inst. Pasteur), 1974, 125, p. 373—389.
20. Köhler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predetermined specificity.— Nature, 1975, 256, p. 495—497.
21. Köhler G. Soft agar cloning of lymphoid tumour lines: detection of hybrid clones with anti-SRBC activity.— In: Immunological methods. New York: Acad. press, 1979, p. 397—401.
22. Koprowski H., Steplewski Z., Herlyn D., Herlyn M. Study of antibodies against human melanoma produced by somatic cell hybrids.— Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978, 75, N 7, p. 3405—3409.
23. Krim M., Edy V. G., Stewart W. E. et al. Interferon.— In: Current chemotherapy and infectious disease. Proc. 11th ICC and 19th ICAAC Amer. Soc. Microbiol., 1980, p. 1417—1426.
24. Langone J. J., Boyle M. D. P., Borsos T. ¹²⁵I-protein A: applications to the quantitative determination of fluid phase and cell-bound IgG.— J. Immunol. Methods, 1977, 18, p. 281—293.
25. Ledbetter J. A., Herzenberg L. Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens.— Immunological Rev., 1979, 47, p. 63—90.
26. Lefkowitz I. Limiting dilution analysis.— In: Immunological methods. New York: Acad. press, 1979, p. 355—370.
27. Lemke H., Hämmerling G. J., Hämmerling U. Fine specificity analysis with monoclonal antibodies of antigens controlled by the major histocompatibility complex and by the Qa/TL region in mice.— Immunological Rev., 1979, 47, p. 175—206.
28. Lindstrom J. Autoimmune response to acetylcholine receptor in myasthenia gravis and its animal model.— Adv. Immunology, 1979, 27, p. 1—50.
29. Locarnini S. A., Garland S. M. Immunosorbent assay for detection of hepatitis B surface antigen.— J. Clin. Microbiol., 1977, 15, p. 277—282.
30. Massey R. J., Schochetman G. Blocking antibodies that inhibit the binding of antibodies to antigens.— J. Clin. Microbiol., 1977, 15, p. 447—449.
31. Present W. A., King M. P., E. antibodies to hepatitis B surface antigen.— J. Clin. Microbiol., 1977, 15, p. 929.
32. Reth M., Kelsoe G., Rajewsky R. Idiotypes and antibodies.— Nature, 1979, 278, p. 592—594.
33. Reth M., Bothwell A. L. M., site and of idiotypes in the expression of their genes.— Nature, 1979, 278, p. 592—594.
34. Ruscetti F. W., Morgan D. L. Isolation of human T cells containing T cell receptors.— J. Clin. Microbiol., 1979, 19, p. 131—138.
35. Thorell J. I., Larson S. M. The C. V. Mosby Co., 1978, 2.
36. Trucco M. M., Garotta G., against HLA structures.— In: Immunological methods. New York: Acad. press, 1979, p. 355—370.
37. Tzartos S. J., Lindstrom J. Monoclonal antibodies: Localization of their binding sites between subunits.— Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, 77, N 8, p. 4539—4543.
38. Yalow R. S. Radioimmunoassay.— J. Clin. Endocrinol., 1971, 32, p. 1—14.

Институт биохимии им. А. В. Г.
АН УССР, Киев

УДК 612.173.1:612.017:616.12—092

Г. М. Бутенко,

Значительный прогресс и в пространению иммунологической науки и, в частности, в кардиологии заключается использование ра-сердечной мышцы с использованием го аппарата миокарда [24].

Еще более перспективны ных антител к специфическим зывается, таким образом, ак-лиз антигенных компонентов явиться существенным также тии сердечной патологии, пос-разные виды сердечной патол-домиокардиальный фиброз [3- [31], идиопатические семейны В ряде исследований просле-одной стороны, и частотой о-с другой [3, 16, 58, 59]. В-антител к антигенам собствен-осложнений, что широко обсу-

Антигенность ткани серд-наличием в ткани высокомоде-но всем мышечным белкам, [11, 46]. К структурным бел-миозин (сходные с таковыми в состав саркоплазмы, относ-белки: миоглобин, глобулин Е

29. Locarnini S. A., Garland S. M., Ledman N. I. et al. Solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay for detection of hepatitis A virus.—J. Clin. Microbiol., 1978, 8, N 3, p. 277—282.
30. Massey R. J., Schochetman G. Viral epitopes and monoclonal antibodies: isolation of blocking antibodies that inhibit virus neutralization.—Science, 1981, 213, N 4506, p. 447—449.
31. Present W. A., King M. P., Bland A. F. et al. Characterization of murine hybridoma antibodies to hepatitis B surface antigenic determinant.—Feder. Proc., 1980, 39, N 3, patr. 2, p. 929.
32. Reth M., Kelsoe G., Rajewsky K. Idiotype regulation by isologous monoclonal anti-idiotypic antibodies.—Nature, 1981, 290, N 5803, p. 257—259.
33. Reth M., Bothwell A. L. M., Rajewsky K. Structural properties of the hapten binding site and of idiotopes in the NP antibody family.—In: Immunoglobulin idiotypes and their expression. New York: Acad. press, 1981, p. 138—145.
34. Ruscetti F. W., Morgan D. A., Gallo R. C. Functional and morphologic characterization of human T cells continuously grown *in vitro*.—J. Immunol., 1975, 119, N 1, p. 131—138.
35. Thorell J. I., Larson S. M. Radioimmunoassay and related techniques.—Saint Louis: The C. V. Mosby Co., 1978. 298 p.
36. Trucco M. M., Garotta G., Stocker J. W., Ceppellini R. Murine monoclonal antibodies against HLA structures.—Immunol. Rev., 1979, 47, p. 219—252.
37. Tzartos S. J., Lindstrom J. Monoclonal antibodies used to probe acetylcholine receptor structure: Localization of the main immunogenic region and determination of similarities between subunits.—Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, 77, N 2, p. 755—759.
38. Yalow R. S. Radioimmunoassay.—Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 1980, 9, p. 327—345.

Институт биохимии им. А. В. Палладина
АН УССР, Киев

Поступила в редакцию
5.IV 1982 г.

УДК 612.173.1:612.017:616.12—092

Г. М. Бутенко, А. А. Мойбенко, О. В. Шабловская

АНТИГЕНЫ СЕРДЦА

Значительный прогресс иммунологии в последние два десятилетия привел к распространению иммунологических подходов и методов в другие области медицинской науки и, в частности, в кардиологию. В настоящее время весьма перспективным представляется использование радиоиммунных методов для диагностики повреждений сердечной мышцы с использованием F_{ab}-фрагментов антител к миозину сократительно-го аппарата миокарда [24].

Еще более перспективным может быть получение и использование моноклональных антител к специфическим антигенам миокарда, детальное изучение которых оказывается, таким образом, актуальным направлением современных исследований. Анализ антигенных компонентов тканей сердца, «забарьерных» тканевых веществ, может явиться существенным также для понимания роли аутоиммунных процессов в развитии сердечной патологии, поскольку признаки аутоиммунности объединяют разнообразные виды сердечной патологии: поражения сердца при ревматизме [12, 42, 44], эндомикардиальный фиброз [34], инфаркт миокарда [7, 30], постинфарктный синдром [31], идиопатические семейные миокардиодистрофии [48], вирусные миокардиты [53]. В ряде исследований прослеживалась корреляция между тяжестью заболевания, с одной стороны, и частотой обнаружения и титрами антител к сердечным антигенам, с другой [3, 16, 58, 59]. В связи с этим реально предположение о патогенной роли антител к антигенам собственного сердца в развитии основного заболевания или его осложнений, что широко обсуждается в литературе [2, 8, 15].

Антигенность ткани сердечной мышцы показана экспериментально и обусловлена наличием в ткани высокомолекулярных белков и липидов. Белки ткани сердца, подобно всем мышечным белкам, подразделяются на структурные и саркоплазматические [11, 46]. К структурным белкам относятся миозин, актин, α-актин, тропонин, тропомиозин (сходные с таковыми скелетной мышцы). К неструктурным белкам, входящим в состав саркоплазмы, относятся растворимые в солевых средах низкой ионной силы белки: миоглобин, глобулин Вебера и гетерогенная белковая система миогена, облада-