

УДК 57.083.3

О. В. Остроух¹, Е. В. Плаксицкая²¹Белорусский государственный технологический университет²УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси»**ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА ДИАГНОСТИЧЕСКИХ НАБОРОВ
НА ОСНОВЕ РАДИОАКТИВНЫХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ**

В работе показаны возможные направления совершенствования технологии производства диагностических наборов на основе радиоактивных моноклональных антител.

Исследован процесс активации моноклональных антител методом кислотной обработки, выяснено ее влияние на антитела для изучения возможности внедрения результатов в производство диагностических наборов реагентов.

В ходе эксперимента использовались моноклональные антитела к пролактину. При выполнении работы выяснилось, что активация антител является необходимой операцией при изготовлении твердофазного покрытия для диагностического набора. Были определены оптимальные рабочие условия активации моноклональных антител: значение pH активирующего раствора – 2,5; буферный активирующий раствор – 0,1 М HCl-глицин; концентрация антител активирующего раствора – 300 мкг/мл; продолжительность проведения процесса активации – 10 мин; нейтрализация после активации – с помощью покрывающего буферного раствора (0,1 М бикарбонатный буфер). Также было установлено, что при проведении активации моноклональных антител (перед иммобилизацией на внутреннюю поверхность пластиковых пробирок) концентрацию антител в покрывающем буфере можно уменьшить, что приведет к снижению себестоимости диагностических наборов реагентов.

Ключевые слова: иммунорадиометрический анализ, диагностические наборы реагентов, активация моноклональных антител, HCl-глицин.

O. V. Ostroukh¹, E. V. Plaksitskaya²¹Belarusian State Technological University²UE “PP IBC National Academy of Sciences of Belarus”**TECHNOLOGY OF PRODUCTION OF DIAGNOSTIC KITS
BASED ON RADIOACTIVE MONOCLONAL ANTIBODIES**

The article gives possible directions of improving the technology for the production of diagnostic kits based on radioactive monoclonal antibodies.

The process of activation of monoclonal antibodies by the acid treatment method was studied, its effect on antibodies was clarified to study the possibility of introducing the results into the production of diagnostic reagent kits.

During the experiment, monoclonal antibodies to prolactin were used. When performing the work, it turned out that the activation of antibodies is a necessary operation in the manufacture of solid-phase coatings for the diagnostic kit. The optimal operating conditions for the activation of monoclonal antibodies were determined: pH of the activating solution – 2.5; buffer activating solution – 0.1 M HCl-glycine; the concentration of antibodies of the activating solution – 300 µg/ml; the duration of the activation process – 10 minutes; neutralization after activation using a coating buffer solution (0.1 M bicarbonate buffer). It was also found that when monoclonal antibodies are activated (before immobilization on the inner surface of plastic tubes), the concentration of antibodies in the coating buffer can be reduced, which will reduce the cost of diagnostic reagent kits.

Key words: immunoradiometric analysis, diagnostic reagent kits, activation of monoclonal antibodies, HCl-glycine.

Введение. Иммунная система вырабатывает специфические антитела на множество различных антигенов. В основе такой способности лежит наличие большого разнообразия клонов лимфоцитов, каждый из которых вырабатывает антитела одного типа.

В результате иммунного ответа организма на определенный антиген в реакцию вовлекается

множество клонов, что приводит к образованию высокогетерогенного продукта – поликлональной сыворотки, представляющей собой смесь антител.

Существует возможность получения антител определенной специфичности (моноклональных антител), которые могут использоваться в том числе для диагностики и терапии различных заболеваний человека [1–3].

В настоящее время для количественного определения различных биологически активных веществ широко используются методы, основанные на конкурентном связывании веществ со специфическими связывающими системами.

В иммунорадиометрическом методе анализа в качестве связывающего компонента используются моноклональные антитела (МКАТ), фиксированные на твердофазном носителе – внутренней поверхности пробирок.

При проведении анализа на твердую фазу адсорбируют моноклональные антитела, специфичные в отношении тестируемого антигена.

Затем в пробирки вводят сыворотку крови человека, количество антигена в которой требуется определить, и добавляют радиоактивно меченые МКАТ.

Пробирки инкубируют, в результате иммунной реакции на поверхности твердой фазы образуется трехслойный комплекс (иммобилизованные антитела – антиген – меченые антитела).

В таком комплексе концентрация определяемого антигена пропорциональна концентрации меченых антител, детектирующий агент которых обеспечивает регистрируемый сцинтилляционным счетчиком сигнал.

Таким образом, главными компонентами диагностического набора являются [4]:

- антитела, связанные с твердой фазой (твердофазное покрытие);
- диагностические антитела, меченые радиоизотопами;
- контрольные сыворотки;
- буферный раствор.

Набор ИРМА-ПРОЛАКТИН-СТ используется для диагностики различных эндокринных нарушений: функционального бесплодия, нарушения лактации и т. д.

На сегодняшний день для производства твердофазного покрытия для набора ИРМА-ПРОЛАКТИН-СТ проводится непрямо адсорбция МКАТ – связывание антител с внутренней поверхностью пробирок происходит через авидин-биотиновые мостики.

Концентрация МКАТ составляет 2 мкг/мл, однако нанесение покрытия в этом случае представляет собой сложный, трудоемкий и дорогостоящий процесс.

Пассивная (прямая) адсорбция МКАТ представляет интерес в силу своей простоты, однако в ходе проведенных экспериментов было выявлено, что при сохранении антигенсвязывающей активности минимально допустимая концентрация МКАТ при нанесении составляет 5 мкг/мл.

В пользу прямой адсорбции свидетельствует и тот факт, что антитела в принципе обладают гидрофобными свойствами и поэтому хорошо связываются с пластиком. Предварительная

обработка антител в условиях, характеризующихся низким значением величины рН, может увеличить гидрофобность, предположительно путем изменения конформации, в результате чего больше гидрофобных участков становятся доступными [5].

При выполнении работы была исследована возможность модификации конфигурации антител путем кислотной обработки, а также снижения концентрации МКАТ при нанесении.

Основная часть. В случае формирования твердофазного покрытия путем прямой адсорбции необходимо учитывать влияние на процесс различных факторов.

Обработка антитела перед формированием покрытия. Существуют различные способы обработки: раствором с кислотным рН, мочевиной, высокотемпературным воздействием.

Активация молекулы более четко выявляет гидрофильные и гидрофобные зоны иммуноглобулина. При формировании покрытия это вызывает улучшение связывания, увеличивая таким образом сигнал при анализе. Однако активирование некоторых типов антител может остаться без всякого эффекта, а может привести и к пагубным последствиям.

Изоэлектрическая точка. Величины изоэлектрического значения рН белков отличаются друг от друга в зависимости от содержания аминокислот – каждый белок характеризуется собственной способностью фиксироваться на пластинковой поверхности. Если белки значительно заряжены, то межмолекулярное отталкивание усиливается с увеличением количества «занятых» мест на поверхности твердой фазы.

Твердофазные покрытия не обладают постоянными электрическими зарядами, значит, не могут приводить в действие ионные механизмы. Используемый для покрытия белок находится в состоянии, равном или близком к его изоэлектрической точке. В этом случае наблюдается максимальная адсорбция, так как белковые электростатические силы отталкивания в этот момент имеют самый низкий уровень. В этих условиях десорбция антител является минимальной.

Покрывающие буферные растворы. Максимум адсорбции иммуноглобулина достигается в условиях, близких к его изоэлектрической точке – эту информацию следует учитывать при выборе покрывающего буферного раствора. Однако связи между твердой фазой и белком могут иметь как гидрофильную, так и гидрофобную природу. Поскольку тип связей влияет на процесс адсорбции на твердой фазе, при выборе покрывающего буферного раствора рассматривают химическую природу солей, рН буферного раствора, молярность и ионную силу.

Концентрация раствора. За порогом определенной концентрации покрывающего раствора степень связывания становится постоянной и не зависит от количества белка, участвующего в процессе. На этой стадии покрытая поверхность твердой фазы представляет примерно треть всей ее поверхности. За этим пределом невозможность дополнительного однослойного связывания обусловлена стереохимическим переполнением. Но увеличение концентрации покрывающего раствора может вызвать усиление связывания из-за белок-белковых взаимодействий. Однако эти вторичные взаимодействия не являются стабильными и влияют на качество анализа, так как увеличивается риск десорбции.

Молекулярный вес белка. Он не влияет на возможность самого процесса связывания, однако оказывает значительное воздействие на степень связывания. Если выше определенной концентрации покрывающего раствора степень связывания остается неизменной, значит, на поверхности твердой фазы уже имеется один слой покрытия – увеличение степени связывания в данном случае становится невозможным из-за стереохимического переполнения.

Продолжительность процесса адсорбции. Фиксирование антител на твердой фазе происходит быстро – около 90% антител связываются в течение первого часа. Затем процесс значительно замедляется по причине уменьшения количества антител в покрывающем растворе, а также уменьшения числа активных участков на твердофазном покрытии и затруднения доступа антител к ним. Таким образом, увеличение продолжительности может привести к росту числа нестабильных участков фиксации и вызвать искажение анализа, вызванное десорбцией.

Температура. Поскольку взаимодействия гидрофобного типа являются эндотермическими, то адсорбция растет с увеличением температуры. В случае взаимодействий гидрофильного типа с увеличением температуры адсорбция уменьшается.

Формирование твердофазного покрытия подразумевает выполнение после адсорбции ряда операций (постпокрытие), которые закладывают основу промышленного производства и обеспечивают стабильное качество анализа:

- десорбция нестабильно связанных антител;
- насыщение (формирование нейтралитета твердой фазы к неспецифическим белкам, присутствующим в аналитической среде);
- защита твердофазного покрытия от агрессивного воздействия окружающей среды, гарантирующая стабильность при длительном хранении;
- сушка.

Десорбирующий буфер обычно выбирается идентичным покрывающему раствору.

Насыщение заключается в связывании с непрореагировавшими с антителом активными участками твердой фазы нейтрального белка. Нейтральным белком выступает бычий сывороточный альбумин, легко и быстро фиксирующийся на пластике.

Для защиты покрытия (формирования «сверхслоя») в основном используются водорастворимые полимеры или сахароза.

Насыщение и защиту твердой фазы чаще всего проводят одновременно.

Завершающим этапом является сублимационная сушка, поскольку замораживание закрепляет антитело в конформации, существовавшей в конце операции нанесения покрытия.

Основные операции по формированию твердофазного покрытия в условиях эксперимента осуществляли следующим образом.

Модифицирование конфигурации антитела осуществляли путем кислотной обработки с целью создания более благоприятных условий для его связывания с твердой фазой. Воздействие активирующего раствора (буфер HCl-глицин 0,1 М + антитело в 0,05 М фосфатном буферном растворе, pH = 7,0) изучали при различных значениях pH (1,5; 2,0; 2,5 и 3,0).

Молярность буферного активирующего раствора подбирали с учетом возможности поддержания выбранной величины pH вне зависимости от объема раствора антител.

В ходе оптимизации рабочих условий предобработки антител были рассмотрены концентрации антител активирующего раствора в ряду 100, 200 и 300 мкг/мл. Максимальное связывание антител с антигеном было обнаружено в пробирках, куда были нанесены антитела с концентрацией при активации 300 мкг/мл.

При выборе продолжительности обработки в процессе активации (10, 20 и 30 мин) учитывали, что увеличение продолжительности ведет к потере иммунореактивности из-за денатурации антител.

Использование малых количеств антител на стадии развития твердой фазы позволило нейтрализовать активированный раствор с помощью самого покрывающего буфера.

Антитела, находящиеся в буферном растворе, приводили в контакт с твердой фазой в течение часа при комнатной температуре для облегчения последующего проведения данной операции в промышленных масштабах. Затем твердую фазу дважды промывали этим же фосфатным буфером. Постпокрытие выполняли в фосфатном буфере, содержащем 50 г/л сахарозы и 1 г/л бычьего сывороточного альбумина, при комнатной температуре.

Заключение. При выполнении работы выяснилось, что активация МКАТ положительно

сказывается на процессе формирования покрытия. В результате проведения исследований были определены оптимальные рабочие условия активации моноклональных антител:

- значение pH активирующего раствора – 2,5;
- буферный активирующий раствор – 0,1 М HCl-глицин;
- концентрация антител активирующего раствора – 300 мкг/мл;
- продолжительность проведения процесса активации – 10 мин;

– нейтрализация после активации – с помощью покрывающего буферного раствора (0,1 М бикарбонатный буфер).

Также были проведены эксперименты с целью уменьшения концентрации МКАТ при нанесении. В результате выявлено, что концентрацию антител при формировании твердофазного покрытия путем прямой адсорбции можно уменьшить с 5 до 3 мкг/мл, что приведет к снижению себестоимости диагностических наборов реагентов.

Литература

1. Плаксицкая Е. В., Остроух О. В. Антитела, применяемые в диагностических наборах, и способы их получения // Биотехнология: взгляд в будущее: сб. науч. трудов III Междунар. науч.-практ. конф., Ставрополь, 28 апр. 2017 г. / Ставропол. гос. мед. ун-т; редкол.: Е. В. Щетинин [и др.]. Ставрополь, 2017. С. 154–160.
2. Therapy of chronic lymphocytic leukemia and cutaneous T-cell lymphoma with T101 monoclonal antibody / R. O. Dillman [et al.] // *J. Clin. Oncol.* 1984. Vol. 2, no. 8. P. 881–891.
3. Monoclonal antibody therapeutic trials in seven patients with T-cell lymphoma / R. A. Miller [et al.] // *Blood.* 1983. Vol. 62, no. 5. P. 988–995.
4. Иммунодиагностические реакции: учеб. пособие / Г. К. Давлетшина [и др.]. Уфа: Изд-во ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России, 2014. 92 с.
5. Wild D. G. *The Immunoassay Handbook. Theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques.* Oxford: Elsevier Ltd., 2013. 1036 p.

References

1. Plaksitskaya E. V., Ostroukh O. V. Antibodies used in diagnostic kits and methods for their preparation. *Sbornik nauchnykh trudov III Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii "Biotehnologiya: vzglyad v budushcheye"* [Collection of scientific papers of the III International scientific and practical conference "Biotechnology: a look into the future"]. Stavropol, 2017, pp. 154–160 (In Russian).
2. Dillman R. O., Shawler D. L., Dillman J. B., Royston I. Therapy of chronic lymphocytic leukemia and cutaneous T-cell lymphoma with T101 monoclonal antibody. *J. Clin. Oncol.*, 1984, vol. 2, no. 8, pp. 881–891.
3. Miller R. A., Oseroff A. R., Stratte P. T., Levy R. Monoclonal antibody therapeutic trials in seven patients with T-cell lymphoma. *Blood*, 1983, vol. 62, no. 5, pp. 988–995.
4. Davletshina G. K., Gabidullin Z. G., Akhtarieva A. A., Tuygunov M. M., Bulgakov A. K., Savchenko T. A., Khusnarizanova R. F., Gabidullin Yu. Z., Alsynbaev M. M. *Immunodiagnosticheskiye reaktсии* [Immunodiagnostic reactions]. Ufa, GBOU VPO BGMU Minzdrava Rossii Publ., 2014. 92 p.
5. Wild D. G. *The Immunoassay Handbook. Theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques.* Oxford, Elsevier Ltd., 2013. 1036 p.

Информация об авторах

Остроух Олег Владиславович – кандидат технических наук, доцент кафедры биотехнологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: ostrouxx@belstu.by

Плаксицкая Екатерина Витальевна – магистр биологических наук, инженер-технолог. УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси» (220141, г. Минск, ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/3, Республика Беларусь). E-mail: e.polishchuk@inbox.ru

Information about the authors

Ostroukh Oleg Vladislavovich – PhD (Engineering), Assistant Professor, the Department of Biotechnology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ostrouxx@belstu.by

Plaksitskaya Ekaterina Vital'yevna – Master of Biology, Process Engineer. UE "PP IBC National Academy of Sciences of Belarus" (5/3, Akademika V. F. Kuprevicha str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: e.polishchuk@inbox.ru

Поступила 12.11.2019