

ОДЕРЖАННЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ НОВИХ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ ДО IgE ЛЮДИНИ

О. Ю. ГАЛКІН^{1,2}, А. А. САВЧЕНКО¹, К. І. НІКІТИНА¹, О. М. ДУГАН¹

¹Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»;

²ТОВ «Хема», Київ, Україна;

e-mail: alexfbt@mail.ru

Одержано оригінальний набір із 12 клонів гібридом, продуцентів моноклональних антитіл (мАт) до IgE людини. Проведено поглиблене вивчення біологічних властивостей антитіл: встановлено їх специфічність, константу афінності та титр у культуральній рідині. Одержано мАт, спрямовані до двох епітопних регіонів на молекулі IgE. Перша група мАт належить до епітопного регіону, що представлений трьома епітопами (два з яких перекриваються та один, що не перекривається з іншими). Другий епітопний регіон представлений лише одним епітопом.

Ключові слова: моноклональні антитіла, гібридоми, IgE людини, афінність, епітопне картування.

Однією з головних задач імунної системи є захист організму від різноманітних інфекцій. Є низка факторів природного імунітету, клітинного та гуморального, які відповідають за боротьбу з інфекційними агентами. Імуноглобуліни, які знаходяться в біологічних рідинах організму, є найважливішими ефекторами гуморальної імунної відповіді. Імуноглобулін Е (IgE) синтезується переважно в лімфоїдній тканині шкіри, дихальних шляхів, кишок та лімфатичних вузлах, які їх дренують. Основна функція IgE пов'язана із захистом організму від гельмінтів та найпростіших паразитів [1–5]. IgE відіграє також важливу роль у гіперчутливості типу I, яка проявляється різними алергічними захворюваннями, такими як алергічна астма, алергічний риніт, харчова алергія, atopічний дерматит, анафілаксія тощо. Серед арсеналу реагентів, які застосовуються для визначення IgE, провідне місце належить відповідним специфічним антитілам. У поліклональних сироватках до імуноглобулінів людини є низка недоліків (неспецифічне зв'язування, перехресна реактивність, недостатня відтворюваність досліджень тощо), які істотно обмежують їх використання [6–8]. Придатнішими реагентами в цьому разі є анти-IgE моноклональні антитіла (мАт). До переваг останніх можна віднести виключну специфічність, гомогенність та можливість одержання практично необмеженої кількості. Маючи на озброєнні панель мАт до імуноглобулінів людини певного класу, можливо відібрати високоафінні та специфічні клони, ті, що дають найкращі результати в

певній тест-системі. Відомо, що для розробки будь-якого імуноензимного тест-набору необхідно мати широкий набір відповідних мАт, адже, зазвичай, із всієї панелі антитіл лише одне чи декілька виявляють задовільні результати [9–11].

Метою нашої роботи було: вибір схеми імунізації та одержання мАт до IgE людини, вивчення їхніх властивостей та відбір діагностично значущих.

Матеріали і методи

Одержання мАт. Для імунізації мишей лінії Balb/c використовували IgE людини, одержаний за методикою [12]. Імунізацію проводили в подушечки задніх лапок мишей в сумарній дозі 50 мкг IgE на тварину. Перші дві ін'єкції здійснювали з повним ад'ювантом Фрейнда (Sigma, США), а третю – без ад'юванта. Імунізація тривала 7–8 днів. На третій день після останньої ін'єкції антигену проводили гібридизацію лімфоцитів, одержаних із регіонарних лімфатичних вузлів мишей, з клітинами міеломи Sp 2/0. Злиття здійснювали за допомогою поліетиленгліколю 3500–3700 (Sigma, США) за методикою Kohler і Milstein [13] у модифікації Lane і Korowski [14]. Одержані клони гібридом вирощували на фідери з перитонеальних макрофагів у повному ростовому середовищі [H-Y (Sigma, США) з 15%-ї ембріональної телячої сироватки (ETC, Sigma, США)] з додаванням середовища НАТ (Sigma, США). Клітини культивували на 96-лункових планшетах для культур клітин (Costar, США).

На 10–12-й день клони, що зростають, тестували на IgE людини в непрямому твердофазному імуноензимному аналізі (ТІЕА). Позитивними вважали лунки, сигнал в яких у 2–3 рази перевищував контроль кон'югату. Гібридами з таких лунок пересаджували на 24-лункові планшети з фідером із перитонеальних макрофагів і культивували в повному ростовому середовищі з додаванням середовища НТ (Sigma, США), розмножували і заморожували в середовищі, що містить 50% сироватки новонароджених телят (Sigma, США), 43% середовища DMEM (Sigma, США), 7% диметилсульфоксиду (Sigma, США). Відібрані культуральні рідини використовували для визначення специфічності мАт, їхнього титру і константи афінності, а також ізотипу. Специфічність мАт перевіряли в непрямому ТІЕА за тестування на IgE, IgA, IgG і IgM людини, а також на Fc-фрагменти IgE. Для наступного аналізу відбирали гібридами, що синтезують найбільш специфічні і високоафінні мАт, ті, які давали позитивну відповідь під час тестування на IgE людини та їхні Fc-фрагменти і не мали перехресних реакцій з іншими класами імуноглобулінів. Відібрані клони гібридом розморожували і клонували кілька разів до повної стабільності за рівнем синтезу антитіл. Клонування здійснювали методом лімітувальних розведень на фідері з перитонеальних макрофагів у повному ростовому середовищі. Скринінг клонів гібридом, що зростають, проводили на IgE у непрямому ТІЕА.

Гібридами, що стабільно продукували антитіла, розмножували і для одержання асцити вводили мишам, які попередньо були праймовані пристаном (Sigma, США). мАт виділяли з асцитної рідини дворазовим осадженням Na_2SO_4 в концентраціях 18 і 16% вага на об'єм [15]. Одержані в такий спосіб мАт використовували для приготування пероксидазних кон'югатів.

Процедура непрямого ТІЕА. Сорбцію IgE і Fc-фрагментів IgE проводили в 0,05 М карбонат-бікарбонатном буфері (рН 9,6) протягом ночі при 4 °С в концентрації 5 і 2,5 мкг/мл відповідно. Для відмивання використовували фосфатно-сольовий буфер із додаванням 0,05% твіну-20 (ФСБТ), рН 7,2 – 7,4. Планшет інкубували 1 год при 37 °С і потім відмивали. Для виявлення зв'язаних антитіл використовували кон'югат козиних антитіл до імуноглобулінів миші з пероксидазою хрому (ПХ), який інкубували 1 год при кімнатній температурі. Планшет тричі відмивали ФСБТ

і один раз водою. Як субстрат використовували 0,003%-й розчин пероксиду водню в 0,15 М цитратному буфері (рН 5,0), а як хромоген – 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ). Реакцію зупиняли 2 М сірчаною кислотою. На спектрофотометрі вимірювали абсорбцію за довжини хвилі 450/620 нм.

Конкурентний ТІЕА. Цю модифікацію аналізу використовували для встановлення епітопної специфічності одержаних мАт. IgE людини сорбували в 0,05 М карбонат-бікарбонатному буфері в концентрації 5 мкг/мл на 96-лункові планшети для ТІЕА. Планшет інкубували протягом ночі при 4 °С і потім двічі відмивали ФСБТ. У всі лунки планшета вносили досліджуваний пероксидазний кон'югат мАт. Після чого в лунки різних рядів для конкуренції вносили мАт інших клонів у різних концентраціях, починаючи з 0,4 мг/мл та кожного наступного разу зразок розводили удвічі. Як контроль використовували різницю значення абсорбції кон'югату мАт та абсорбції однойменних мАт інших клонів. Подальшу процедуру проводили як для непрямого ТІЕА.

Визначення афінності антитіл. Константу афінності мАт визначали методом інгібування за Friguet зі співавт. [16] та розраховували за рівнянням, запропонованим Бобровником і співавт. [17]. Різні концентрації IgE (від 10^{-9} до 10^{-6} моль/л) змішували зі зразками культуральних рідин, що містять мАт. Проінкубовані зразки (1 год при 37 °С) переносили в 96-лунковий планшет, попередньо сенсibilізований IgE людини. Далі здійснювали процедуру непрямого ТІЕА. Як контроль використовували зразки культуральних рідин, що попередньо не інкубували з IgE.

Визначення ізотипу мАт. Ізотип одержаних мАт визначали з використанням стандартного набору для ізотипування ISO-2 (Sigma, США). Ізотипування проводили за допомогою антигенопосередкованого ТІЕА. Для цього в планшет, сенсibilізований IgE людини, вносили культуральні рідини гібридом у шести повторностях. Ізотип визначали за допомогою моноспецифічних козиних сироваток. Тип антитіл виявляли антикозиним пероксидазним кон'югатом (Sigma, США). Облік результатів проводили відповідно до рекомендацій виробника.

Синтез пероксидазних кон'югатів. Кон'югування мАт із ПХ проводили в масовому співвідношенні антитіл до ензиму 2 : 1 методом періодатного окислювання за Tijssen [18] із модифікаціями. ПХ (Sigma, США) розчиняли в 0,1 М бікарбонатному буфері

(рН 8,3) до концентрації 15 мг/мл і додавали рівний об'єм водного розчину періодату натрію концентрацією 14 мМ. Для окислення ПХ суміш інкубували 2 год при кімнатній температурі. Одержаний розчин окисленої ПХ змішували з розчином антитіл, діалізованих проти 0,1 М карбонатного буфера (рН 9,2). Суміш переносили у хроматографічну колонку і додавали 1/3 частину сухого сефадексу G-25 (Fluka, Швейцарія), інкубували 3 год при кімнатній температурі. Розчин кон'югату елюювали з колонки і додавали 1/20 об'єму частину водного розчину NaBH_4 (5 мг/мл). Для зупинки реакції суміш залишали на 30 хв при кімнатній температурі, додавали ще 3/20 частини розчину NaBH_4 , інкубували 60 хвилин. Одержаний розчин пероксидазного кон'югату мАт діалізом переводили в 0,02 М фосфатний буфер, що містив 0,15 М NaCl .

Дослідження із тваринами проводили з дотриманням біоетичних норм [19].

Результати та обговорення

Внаслідок здійсненої гібридизації було одержано більш ніж 700 клонів гібридом. З метою ефективного відбору клонів супернатанти тестували: на IgE людини для первинного відбору, на Fc-фрагменти IgE для визначення специфічності, а також на IgM, IgA та IgG людини для визначення перехреснореагуючих мАт. Під час первинного тестування після гібридизації специфічні до IgE людини антитіла виявлено в усіх лунках семи планшетів. З метою виявлення найактивніших клонів гібридом культуральні рідини для скринінгу розводили в кілька разів, що дозволяло відчутно знизити фоновий сигнал. Таким чином, відібрано 41 клон, що мав найвищі сигнали за результатами ПІЕА. Всі відібрані гібридами було кріоконсервовано, а культуральні рідини залишено для подальшого вивчення. Після повторного тестування на IgE людини висока активність мАт підтвердилася у 24 клонів гібридом (табл. 1).

Для забезпечення високої специфічності та чутливості мАт на наступному етапі перевіряли супернатанти відібраних клонів гібридом на перехресну активність з IgM, IgG та IgA людини, а також визначали специфічність мАт до Fc- або Fab-області молекули IgE. Аналіз результатів дослідження показав, що 11 клонів характеризуються високими сигналами під час тестування на IgE людини і Fc-фрагменти IgE і не виявляють перехресної реактивності з IgE, IgG та IgA (гібридами 162B3, 163C10, 163D12, 164F5, 164H3, 164H10, 166A10, 166B7,

166E12, 167B4, 167E7); 8 клонів характеризуються відносно низькими сигналами як на IgE людини, так і на Fc-фрагменти IgE (гібридами 161A7, 161F10, 161H5, 163B3, 164G8, 165C12, 166F3, 167G11); 5 клонів відповідають інтенсивніше на IgE людини, ніж на Fc-фрагменти IgE або засвідчували інтенсивну перехресну реактивність з іншими класами імуноглобулінів (гібридами 161C8, 166A11, 167C7, 167E5, 167G4).

Серед 24 гібридом, відібраних під час повторного скринінгу, для подальшої характеристики залишили лише 19 клонів гібридом, які характеризувалися відносно високими сигналами на IgE людини і Fc-фрагменти IgE і не виявляли перехресної реактивності з іншими класами імуноглобулінів. На наступному етапі роботи необхідно було визначити критерії оцінки антитіл, за якими слід було проводити подальший відбір клонів гібридом. Грунтуючись на власному досвіді та даних літератури [7, 10, 20–21], аналіз гібридом здійснювали за ознаками: титром антитіл у культуральній рідині, афінністю мАт та їх ізотипом. Відбір мАт за першими двома критеріями – титром та афінністю – мав забезпечити високі показники специфічності та чутливості імуноензимного аналізу з використанням таких антитіл.

Під час дослідження ізотипів мАт, синтезованих 19 отриманими гібридомами, було одержано такі результати: 9 антитіл мали IgG1 ізотип, 6 – IgG2b ізотип, 2 – IgM ізотип, 2 – IgG2a ізотип. Сукупність одержаних даних – активність у ПІЕА, ізотип, титр та константа афінності мАт – використовували для остаточного відбору клонів гібридом для їх подальшого розморожування, клонування, нарощування та накопичення антитіл. Для подальших досліджень не використовували гібридами, що продукують антитіла ізотипу IgM. Крім того, перевагу надавали клонам із високим титром ($\geq 1 : 500$) та константою афінності ($\geq 8,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$), а також інтенсивним сигналом у непрямому ПІЕА. Додатково для подальшої характеристики було відібрано клон 164F5, який продукував мАт з доволі низьким титром $1 : 200$, проте з високим показником константи афінності $10,0 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ та високою активністю в ПІЕА. Таким чином, на основі аналізу даних щодо 19 клонів гібридом для подальших досліджень було відібрано 12 гібридом (табл. 1): 161A7, 161H5, 163C10, 163D12, 164F5, 164H3, 164H10, 165C12, 166A10, 166B7, 166F3, 167B4.

Клонування гібридом здійснювали найпростішим та ефективним способом –

Таблиця 1. Характеристика моноклональних антитіл (мАт) до IgE людини

№	Гібридома/ мАт	Оптична густина у ТІЕА ¹⁾					Ізотип антитіл	Титр антитіл у КР ¹⁾	Константа афінності ¹⁾ , 10 ⁹ М ⁻¹	Епітоп
		IgE	Fc-фр. IgE	IgG	IgA	IgM				
1	161A7	2,842	2,742	0,064	0,036	0,045	IgG1	1 : 800	20,0	A3
2	161C8	2,645	2,348	0,450	0,399	1,032	— ²⁾	—	—	—
3	161F10	2,075	2,140	0,042	0,063	0,010	IgG2b	1 : 500	10,0	—
4	161H5	2,872	2,740	0,057	0,048	0,070	IgG1	1 : 800	20,0	A2
5	162B3	3,045	3,005	0,065	0,028	0,101	IgG2a	1 : 200	10,0	—
6	163B3	2,589	2,495	0,052	0,076	0,095	IgG2b	1 : 200	4,0	—
7	163C10	3,220	3,166	0,051	0,083	0,075	IgG1	1 : 500	16,0	A2
8	163D12	3,015	3,097	0,061	0,096	0,036	IgG2a	1 : 800	20,0	B
9	164F5	2,925	2,920	0,079	0,025	0,040	IgG1	1 : 200	20,0	A3
10	164G8	2,340	2,220	0,078	0,072	0,052	IgM	—	—	—
11	164H3	3,005	2,977	0,033	0,045	0,045	IgG2b	1 : 800	20,0	A2
12	164H10	3,017	3,029	0,015	0,030	0,035	IgG1	1 : 1000	28,0	B
13	165C12	2,097	2,111	0,015	0,091	0,045	IgG1	1 : 1000	20,0	A1
14	166A10	2,950	2,901	0,041	0,053	0,029	IgG1	1 : 500	8,0	A1
15	166A11	2,213	0,325	0,054	0,031	0,028	—	—	—	—
16	166B7	3,001	3,101	0,486	0,072	0,069	IgG2b	1 : 500	20,0	A3
17	166E12	2,915	2,918	0,095	0,016	0,083	IgG2b	1 : 200	10,0	—
18	166F3	2,895	2,861	0,017	0,061	0,010	IgG1	1 : 800	20,0	A2
19	167B4	2,906	2,972	0,053	0,048	0,078	IgG2b	1 : 1000	16,0	A1
20	167C7	2,114	3,025	0,037	0,040	0,025	—	—	—	—
21	167E5	2,866	0,078	0,062	0,025	0,082	—	—	—	—
22	167E7	3,072	3,099	0,056	0,025	0,011	IgG1	1 : 100	1,0	—
23	167G4	2,545	3,144	0,051	0,061	0,047	—	—	—	—
24	167G11	2,401	2,342	0,011	0,085	0,098	IgM	—	—	—

¹⁾ Середні значення величин наведено за результатами дослідження супернатантів гібридом у чотирьох повторностях ($P < 0,05$). ²⁾ Параметр не визначали. КР — культуральна рідина.

методом лімітувальних розведень. Всі клони пройшли по 2–3 клонування до майже повної стабільності за рівнем синтезу специфічних мАт. Так, за першого клонування гібридом позитивними виявилися від 40 до 60% лунок. На другому та третьому клонуваннях частка позитивних лунок становила 90–100%. Такий перебіг подій, передусім, пояснюється поступовою загальною стабілізацією геному гібридних клітин після їх кріоконсервування, зокрема розблокуванням генів, які відповідають за синтез імуноглобулінів. Ізольовані позитивні клони з 96-лункового планшета пересаджували на 24-лунковий, гібридами підрощували, заморожували та вводили в асцит мишам Balb/c. На 7–10-й день у тварин накопичу-

вався асцит, який відбирали. Від однієї миші в середньому забирали до 10 мл асцитичної рідини. Після виділення з асцитичної рідини мАт використовували для синтезу пероксидазних кон'югатів.

Порівняльну епітопну характеристику мАт проводили із використанням конкурентного ТІЕА. Результати ефекта розраховували як відсоток зниження активності кон'югату мАт у присутності конкурентного антитіла. У такому варіанті постановки конкурентного ТІЕА повне або часткове зниження активності є показником повної або часткової подібності епітопної специфічності досліджуваних мАт. Натомість порівняна з контрольною активність кон'югату мАт вказувала на

різну із конкурентним антитілом епітопу специфічність. Таким чином, внаслідок проведених досліджень для кожного мАт отримано порівняльний епітопний профіль з 11 варіантів конкуренції з іншими антитілами. З метою полегшення аналізу такого великого масиву даних для порівняння профілей використовували кореляційний аналіз за Браує–Пірсаном. Мірою подібності був коефіцієнт кореляції профілів за умови його статистичної вірогідності ($P < 0,05$). Високі значення позитивних коефіцієнтів кореляції між профілями ($0,75 \leq r \leq 1,00$) трактували як свідчення однакової епітопної специфічності, менші значення ($0,44 \leq r < 0,75$) вважали показником перехресних епітопів, а статистично невірогідні коефіцієнти ($r < 0,44$) розцінювали як доказ незалежних, повністю відмінних епітопів.

Проведена порівняльна епітопна характеристика мАт засвідчила, що досліджувані мАт направлені проти двох епітопних регіонів (ЕР) молекули IgE людини, умовно позначені нами А та В (табл. 2). 10 мАт віднесено до епітопного регіону А (ЕР-А). Слід зазначити, що реактивність цієї групи мАт характеризується середньою гомогенністю: середній коефіцієнт кореляції дорівнює 0,51. Проте ЕР-А містить три епітопи з високою

гомогенністю відповідних мАт: три антитіла (166А10, 167Е7, 167В4) належать до епітопу А1 (середній коефіцієнт – 0,95), 4 антитіла (161Н5, 163С10, 164Н3, 166Е12) – до епітопу А2 (середній коефіцієнт – 0,95) та 3 антитіла (164F5, 166В7, 161А7) – до епітопу А3 (середній коефіцієнт – 0,94). Слід зазначити, що між моноклональними антитілами епітопів А2 та А3 спостерігається виявлена перехресна реактивність (середній коефіцієнт – 0,66). У той самий час між мАт епітопів А1 та А2, а також А1 та А3 перехресна реактивність менш виявлена (середній коефіцієнт для обох пар – 0,44). Одержані дані свідчать про просторову близькість епітопів А1, А2 та А3. Ще 2 мАт (163D12, 164Н10), спрямовані до епітопу В (середній коефіцієнт – 0,96). Слід зауважити, що між мАт ЕР-В та ЕР-А не спостерігається перехресної реактивності, коефіцієнти кореляції становлять 0,12. А це свідчить про цілком різну просторову локалізацію епітопів цих двох регіонів.

Таким чином, одержано оригінальний набір із 12 клонів гібридом, продуцентів високоафінних і специфічних мАт до IgE людини, а також на їх основі пероксидазних кон'югатів. Проведено вивчення біологічних властивостей антитіл: встановлено їхню

Таблиця 2. Порівняльна епітопна характеристика моноклональних антитіл (мАт) до IgE людини

Епітопи	мАт	Епітопні регіони та епітопи											
		В		А1			А2				А3		
		163D12	164Н10	166А10	165С12	167В4	161Н5	163С10	164Н3	166F3	164F5	166В7	161А7
В	163D12	1,00	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	164Н10	0,96	1,00	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
А1	166А10	0,21	0,09	1,00	+	+	–	–	–	±	±	–	–
	165С12	0,12	0,07	0,98	1,00	+	±	–	±	±	±	–	–
	167В4	0,08	0,02	0,91	0,96	1,00	–	±	–	–	±	±	±
А2	161Н5	0,08	0,13	0,39	0,59	0,40	1,00	+	+	+	±	±	±
	163С10	0,04	0,09	0,37	0,35	0,44	0,97	1,00	+	+	+	±	±
	164Н3	0,09	0,14	0,43	0,44	0,37	0,93	1,00	1,00	+	±	+	±
	166F3	0,11	0,11	0,62	0,51	0,42	0,92	0,90	0,95	1,00	+	±	+
А3	164F5	0,15	0,27	0,46	0,59	0,47	0,50	0,57	0,81	0,75	1,00	+	+
	166В7	0,07	0,17	0,32	0,34	0,52	0,54	0,77	0,61	0,67	0,98	1,00	+
	161А7	0,21	0,09	0,38	0,30	0,60	0,57	0,68	0,63	0,76	0,89	0,94	1,00

мАт віднесено до епітопних регіонів і епітопів на основі коефіцієнтів кореляції (r). Статистично вірогідні r ($P < 0,05$) виділено жирним шрифтом. Позначка «+» означає спільні епітопи ($0,75 \leq r \leq 1,00$), «±» – перехресні епітопи ($0,44 \leq r < 0,75$), «–» – незалежні епітопи ($r < 0,44$).

специфічність, константу афінності та титр у культуральній рідині, а також здійснено порівняльну епітопну характеристику антитіл. Встановлено, що одержані мАт спрямовані до двох епітопних регіонів на молекулі IgE. До епітопного регіону А належать три епітопи: близькішими за структурою є епітопи А2 та А3, відносно віддалений від них епітоп А1; епітопний регіон В представлено лише одним епітопом.

ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ НОВЫХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ IgE ЧЕЛОВЕКА

А. Ю. Галкин^{1,2}, А. А. Савченко¹,
Е. И. Никитина¹, А. М. Дуган¹

¹Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт»;
²ООО «Хема», Киев, Украина;
e-mail: alexfbt@mail.ru

Получен оригинальный набор из 12 клонов гибридом, продуцентов моноклональных антител (мАт) к IgE человека. Проведено углубленное изучение биологических свойств антител: установлена их специфичность, константа аффинности и титр в культуральной жидкости. Полученные мАт направлены к двум эпитопным регионам на молекуле IgE. Первая группа мАт относится к эпитопному региону, представленному тремя эпитопами (два из которых перекрываются и один не перекрывающийся с другими). Второй эпитопный регион представлен только одним эпитопом.

Ключевые слова: моноклональные антитела, гибридомы, IgE человека, аффинность, эпитопное картирование.

OBTAINING AND STUDY OF PROPERTIES OF NEW MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST HUMAN IgE

O. Yu. Galkin^{1,2}, A. A. Savchenko¹,
K. I. Nikitina¹, O. M. Dugan¹

¹National Technical University of Ukraine «Kyiv Polytechnic Institute»;
²Hema Ltd., Kyiv, Ukraine;
e-mail: alexfbt@mail.ru

The original set of 12 clones of hybridomas, producers of monoclonal antibodies (mAbs) against human IgE, has been obtained. The study of biological properties of antibodies has been con-

ducted: their specificity, affinity constant and titer in a cultural medium have been established. The obtained mAbs are directed to the two epitope regions on IgE molecule. The first group of mAbs relates to epitope region, represented by three epitopes (two of them overlap and one that does not overlap with others). The second epitope region is represented by only one epitope.

Key words: monoclonal antibodies, hybridomas, human IgE, affinity, epitope mapping.

1. van Halteren A. G. S., van der Cammen M. J. F., Biewenga J. et al. // J. Allerg. Clin. Immunol. – 1997. – **99**, N 1 (1). – P. 94–99.
2. Maizels R. M. // Cur. Op. Immunol. – 2005. – **17**, N 6. – P. 656–661.
3. Hamilton R. G., Williams P. B. // Cur. Op. Immunol. – 2010. – **126**, N 1. – P. 33–38.
4. Salo P. M., Calatroni A., Gergen P. J. et al. // Cur. Op. Immunol. – 2011. – **127**, N 5. – P. 1226–1235.
5. Boyce J. A., Bochner B., Finkelman F. D., Rothenberg M. E. // Cur. Op. Immunol. – 2012. – **129**, N 2. – P. 335–341.
6. Николаєнко І. В., Шинкаренко Л. М., Галкін О. Ю. та ін. // Імунол. алергол. – 2003. – **4**. – С. 7 – 17.
7. Goding J. Monoclonal antibodies. Principles and practice. – San Diego: Academic press, 1996. – 492 p.
8. Vijay H. M., Kumar V., Abebe M., Sevinc S. // J. Allerg. Clin. Immunol. – 2003. – **111**, N 2. – P. S242.
9. Галкін О. Ю., Николаєнко І. В., Раєвська Г. Є. та ін. // Мікробіол. журн. – 2005. – **67**, № 6. – С. 40–48.
10. Галкін О. Ю., Дуган О. М. // Імунол. алергол. – 2009. – **1**. – С. 68–73.
11. Galkin O. Yu. // Укр. журн. клін. лабор. мед. – 2010. – **5**, N 4. – С. 54–60.
12. Галкін О. Ю. // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2013. – **3**. – С. 18–23.
13. Kohler G., Milstein C. // Nature. – 1975. – **256**. – P. 495–497.
14. Lane D., Koprowski H. // Nature. – 1982. – **296**. – P. 200–202.
15. Harlow E., Lane D. Antibodies. A laboratory manual. – N.-Y.: Cold Spring Harbor, 1988. – 726 p.
16. Friguet B., Chaffotte A. F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M. E. // J. Immunol. Methods. – 1985. – **77**, N 2. – P. 305–319.
17. Бобровник С. А., Демченко М. А., Комисаренко С. В. // Укр. біохім. журн. – 2010. – **82**, № 1. – С. 66–69.

18. *Tijssen P.* Practice and theory of enzyme immunoassays // *Lab. Techiques in Biochem. and Molecular Biology.* – 1985. – **15.** – 674 p.
19. *Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко, Г. А. Сайфетдінова.* – К.: Авіцена, 2002. – 156 с.
20. *Reimer C., Phillips D., Aloisio C. et al.* // *Hybridoma.* – 1984. – **3,** N 3. – P. 263–275.
21. *Климович В. Б., Самойлович М. П., Крутецкая И. Ю. и др.* // *Иммунол.* – 1998. – **3.** – С. 27–31.

Отримано 30.01.2013