

Immunomagnetic Sorbents for Human T-Lymphocyte Selection

E.A. Golenkina, A.A. Burkova, V.I. Filippov, O.G. Yershov, P.K. Ivanov
Russian N.N. Blokhin memorial cancer research center RAMS

Key words: *[magnetic microspheres, monoclonal antibodies, immunomagnetic selection, T-lymphocyte depletion, bone marrow transplantation]*

ABSTRACT

Purpose: the development of system for selective depletion of human T-lymphocyte subpopulations.

Materials and methods: Immunospecific particles were obtained by conjugation of magnetite polystyrene microspheres with anti-CD3 or anti-CD8 monoclonal antibodies (Mabs). Various methods of conjugation were used, and selectivity of cell depletion was evaluated using peripheral blood mononuclear cells from normal donors.

Results: the greatest selection efficacy was obtained using magnetite polystyrene microspheres activated by the excess of p-toluenesulphonylchloride. The level of T-cell depletion by anti-CD3- and anti-CD8-Mab conjugates at optimal temperature (resp. 4°C and 13°C) achieved 72 % and 96 %, respectively.

Conclusions: The binding capacity of magnetite polystyrene microspheres for immunoglobulins depends on the chemical composition and characteristics of microsphere surface. Surface modification by attachment of reactive groups for protein covalent binding allows Mabs conjugation in the amounts necessary to produce the surface protein monolayer.

The method of Mabs immobilization on the microsphere surface strongly affects the efficacy of negative cell selection of the conjugates studied. So, the method based on particles activated by p-toluenesulphonylchloride showed the most complete depletion of target cells.

Temperature of cell incubation with immunomagnetic particles was found to be an important factor determining the quality of cell separation. Optimal incubation temperatures for CD3- and CD8-lymphocyte selection were 4°C and 13°C, respectively.

Negative selection using p-toluenesulphonylchloride activated particles conjugated with anti-CD3- and anti-CD8-Mabs at an optimal temperature allows depletion of 72 % CD3⁺-cells and 96 % CD8⁺-cells.

ИММУНОМАГНИТНЫЕ СОРБЕНТЫ В СЕЛЕКЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Е.А. Голенкина¹, А.А. Буркова¹, В.И. Филиппов², О.Г. Ершов², П.К. Иванов¹

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН¹
НПЦ «МедБиоСпектр»²

Ключевые слова: *[магнитные микросферы, моноклональные антитела, иммуномагнитная селекция, деплеция Т-клеток, трансплантация костного мозга]*

РЕФЕРАТ

Цель: Разработка системы селекции для направленного удаления субпопуляций Т-лимфоцитов человека.

Материалы и методы: Для получения иммуноспецифических сорбентов магнетитовые полистироловые микросферы (МПМ) конъюгировали с моноклональными антителами (МКА) против мембранных антигенов

CD3 (клон ICO-90) и CD8 (клон ICO-31). Для антител каждой специфичности были получены и исследованы конъюгаты, различающиеся механизмом поверхностной иммобилизации иммуноглобулинов. Исследования проводили на мононуклеарных клетках периферической крови здоровых доноров.

Результаты: Эффективность селекции была наи-

большей при использовании иммуномагнитных носителей на основе магнитных частиц, активированных избытком п-толуолсульфонилхлорида. При оптимальной температуре (4°C и 13 °C для конъюгатов анти-CD3 и анти-CD8) деплеция по антигенам CD3 и CD8 приводила к удалению 72 и 96% клеток.

Выводы: Способность магнетитовых полистироловых микросфер связывать иммуноглобулины зависит от состава и химических свойств их поверхности. Модификация поверхности МПМ с формированием химических групп для ковалентного связывания протеинов делает возможным иммобилизацию МКА в количестве, необходимом для образования поверхностного протеинового монослоя.

Механизм иммобилизации МКА на поверхности магнитного носителя оказывает существенное влияние на эффективность негативной селекции. Из исследованных типов сорбентов наиболее полное удаление клеток-мишеней обеспечивают конъюгаты на основе частиц, активированных избытком Ts-Cl.

Фактором, влияющим на качество разделения, является температурный режим инкубации клеток с сорбентом. Оптимальная температура инкубации при негативной селекции составляет 13°C для антигена CD8 и 4°C для антигена CD3.

Негативная селекция с использованием конъюгатов анти-CD3 и анти-CD8 на основе частиц, активированных избытком Ts-Cl, при оптимальном температурном режиме приводит к удалению 96 % CD8⁺-клеток и 72 % CD3⁺-клеток.

Введение

На современном этапе развития онкологии лечение высокоэффективными противоопухолевыми препаратами позволяет сохранить жизнь больным, которые раньше считались неизлечимыми. Однако цитотоксичность, лежащая в основе противоопухолевого действия этих препаратов, одновременно является и основным ограничением их применения. От побочных эффектов химиотерапии в первую очередь страдают молодые, активно делящиеся клетки. Наиболее серьезные осложнения связаны с гибелью стволовых гемопоэтических клеток костного мозга, что проявляется в прогрессирующей потере иммунитета, нарушении гомеостаза и анемии. Подобная картина наблюдается и при облучении организма высокими дозами ионизирующих излучений в результате радиотерапии.

Наиболее действенным способом восстановления кроветворных функций организма служит трансплантация аллогенных (донорских) или аутологичных (собственных клеток больного, взятых до лечения и сохраняемых в жизнеспособном состоянии в условиях глубокого холода) гемопоэтических клеток костного мозга или периферической крови. Тем не менее, существует ряд причин, по которым эта процедура далеко не всегда приводит к желаемому терапевтическому эффекту. Трансплантация аутологичного материала сопряжена с риском развития рецидивов заболевания из-за возможной контаминации трансплантата опухолевыми клетками [2]. При пересадке костного мозга от доноров

возникает проблема развития реакции «трансплантат-против-хозяина» (РТПХ), связанная с HLA-несовместимостью донора и реципиента. Проблема подбора HLA-идентичных доноров стоит особенно остро для России, во-первых, в силу отсутствия реально работающего регистра доноров в нашей стране, во-вторых, в связи с малочисленностью семей, что уменьшает вероятность нахождения необходимого донора среди ближайших родственников. Предварительная сепарация трансплантата, приводящая к удалению нежелательных клеток (опухолевых, аллореактивных), решает возникающие проблемы, увеличивая вероятность успеха как аутологичной, так и аллогенной трансплантации.

В клинической практике находят применение два принципиально различных метода пред трансплантационного разделения гемопоэтических клеток: позитивная и негативная селекция материала. С помощью позитивной селекции (обогащения) получают чистые фракции стволовых кроветворных клеток (СКК). Использование СКК, как альтернативы введению цельного костного мозга при аутологичной трансплантации, сводит к минимуму риск повторного заражения пациента опухолевыми клетками и упрощает криоконсервацию материала [6]. Негативная селекция (деплеция) аутологичных клеток применяется для прямой очистки от микрометастазов. В случае аллогенной трансплантации негативная селекция иммунокомпетентных клеток (Т-лимфоцитов) способствует предотвращению развития острой РТПХ. На сегодняшний день в мире не существует однозначного мнения относительно целесообразности полной деплеции Т-клеток. Клинические исследования показывают, что удаление всех Т-лимфоцитов делает невозможным успешное приживление трансплантата [3]. Кроме того, присутствие в трансплантате иммунокомпетентных клеток играет ключевую роль в развитии реакции «трансплантат-против-опухоли». Эти факты побудили поиск подходов к частичной элиминации Т-клеток. Некоторые из разработанных методов предварительной селекции трансплантатов, например, удаление CD4⁺-хелперных клеток с частичным истощением популяции цитотоксических CD8⁺-лимфоцитов [5]; деплеция по антигену CD6 [7, 9], уже проходят клинические испытания. Другие, такие как культивирование клеток реципиента с клетками донора и последующая деплеция активированных клеток по мембранному рецептору CD25, находятся в стадии лабораторных исследований [4].

Среди используемых методов селекции клеток на сегодняшний день одним из наиболее специфичных и эффективных является иммуномагнитная селекция (ИМС). Технология ИМС основана на одновременном использовании строгой избирательности взаимодействия моноклональных антител с мембранными антигенами клеток-мишеней и магнитоуправляемости корпускулярных носителей- магнитных микросфер. Селективно связавшиеся с частицами клетки приобретают магниточувствительность и могут быть извлечены из исходной смеси в неоднородном магнитном поле. Этот нетрудоемкий метод позволяет за корот-

кое время обрабатывать образцы, содержащие до 1010 клеток. Экспериментально показано, что ни микрочастицы, ни процедура сепарации не оказывают существенного влияния на жизнеспособность, морфологию и функциональные качества биологического материала [8].

Целью нашей работы явилась разработка системы селекции для направленного удаления субпопуляций Т-лимфоцитов человека.

Материалы и методы

В последние годы в лаборатории медицинской биотехнологии НИИ ЭДнТО РОНЦ РАМН совместно с Институтом биохимической физики РАН разрабатываются технологии создания мелкодисперсных магнитоуправляемых носителей, представляющих собой композиты на основе магнитомягких ферромагнетиков (оксиды железа, карбонильное железо, микрочастицы металлического железа, полученные плазмохимическим испарением, др.). В зависимости от цели конечного использования микрочастиц, их поверхность может быть сформирована из полистирола, композита на основе $\{SiO_2\}_n$ и активирована для последующего конъюгирования с векторными молекулами.

В работе использовали микросферы диаметром 0,8 мкм, изготовленные методом эмульсионной полимеризации из сополимеров (стирол, дивинилбензол, малеиновый ангидрид) и коллоида магнетита (Fe_3O_4) на основе органических растворителей.

Для получения иммуноспецифических сорбентов магнетитовые полистироловые микросферы (МПМ) конъюгировали с моноклональными антителами (МКА) против мембранных антигенов CD3 (клон ICO-90) и CD8 (клон ICO-31). Для антител каждой специфичности были получены и исследованы конъюгаты, различающиеся механизмом поверхностной иммобилизации иммуноглобулинов:

* Конъюгаты на основе МПМ с поверхностными гидроксильными группами:

а) взаимодействующие с протеинами путем неспецифической сорбции (тип А);

б) связывающие протеины ковалентно после активации *n*-толуолсульфонилхлоридом (Ts-Cl). Были исследованы 2 образца таких частиц: тип В- при активации добавляли 100 мкг Ts-Cl на 1 г фазы, тип С- 500 мкг Ts-Cl на 1 г фазы.

* Конъюгаты на основе МПМ с поверхностными карбоксильными группами для ковалентного связывания иммуноглобулинов с использованием водорастворимых карбодимидов или глутарового альдегида (тип D).

Материалом для селекции служили мононуклеарные клетки периферической крови здоровых доноров, выделенные в градиенте плотности фиколловорографина.

Результаты и обсуждение

Согласно полученным ранее для МПМ с поверхностными гидроксильными группами данным, динамика

поверхностного связывания иммуноглобулинов меняется при переходе от одного клона МКА к другому. Чтобы определить скорость иммобилизации используемых антител на поверхности МПМ типов А, В и С, оценивали концентрацию свободных иммуноглобулинов через 6, 12, 20 и 24 ч инкубации частиц с МКА. По разности начальной и конечной концентраций МКА вычисляли значение сорбционной емкости, *S* (количество связанного белка (мкг) на 1 мг носителя). В случае МПМ, несущих поверхностные карбоксильные группы, для получения сорбентов с разными значениями сорбционной емкости изменяли количество антител, оставляя постоянным время инкубации (12 ч).

Оказалось, что химические свойства поверхности МПМ и, следовательно, механизм связывания магнитной матрицы с иммуноглобулинами, оказывают заметное влияние на способность частиц к связыванию иммуноглобулинов. При получении иммуномагнитных конъюгатов путем неспецифической сорбции МКА на поверхности гидроксильрованных МПМ, была выявлена низкая протеин связывающая способность не активированных микросфер. Максимальная сорбционная емкость частиц (S_{max}), определяемая нами как количество белка, иммобилизованного за сутки инкубации, составила 6,6 мкг/мг и 4,0 мкг/мг для МКА анти-CD3 и анти-CD8. Обработка *n*-толуолсульфонилхлоридом в соотношении 100 мкг активирующего агента на 1 г микросфер повышала сродство частиц к белку, в среднем, в 3,5 раза и обеспечивала возможность связывания до 17,3 и 16,8 мкг/мг МКА. При активации избыточным количеством Ts-Cl максимальная сорбционная емкость увеличивалась еще в 1,1- 1,2 раза и достигала 19,6 мкг/мг и 20,1 мкг/мг фазы (клоны ICO-90 и ICO-31, соответственно). Конъюгаты с самым высоким значением S_{max} , около 30 мкг/мг для обоих МКА, получены при использовании карбоксилированных частиц.

Величина сорбционной емкости является важной характеристикой иммуномагнитных микросфер, заметно влияющей на эффективность сепарации. Согласно данным литературы и результатам предыдущих исследований [1], оптимальным является значение *S*, которое соответствует образованию протеинового монослоя на поверхности полистироловых микрочастиц и может быть рассчитано по формуле:

$$S=6\pi c/cx D,$$

где *C*- параметр, равный для иммуноглобулинов 2,5 мг/м²; *D*- диаметр микрочастиц, мкм; *c*- плотность микрочастиц, г/см³.

Для полученных магнитных микросфер (*D*=0,8 мкм; *c*=1,09 мг/см³) эта величина равна 17 мкг/мг. Поэтому из полученных конъюгатов для дальнейшей работы были выбраны образцы с сорбционной емкостью 16- 18 мкг/мг- в случае частиц В, С и D, и 6,6 (МКА анти-CD3), 4,0 мкг/мг (анти-CD8)- в случае частиц А.

После инкубации с МКА для предупреждения неспецифического взаимодействия частиц с клетками потенциальные свободные сайты связывания белков блокировали человеческим сывороточным альбумином. До использования готовые конъюгаты хранили в 0,01 М

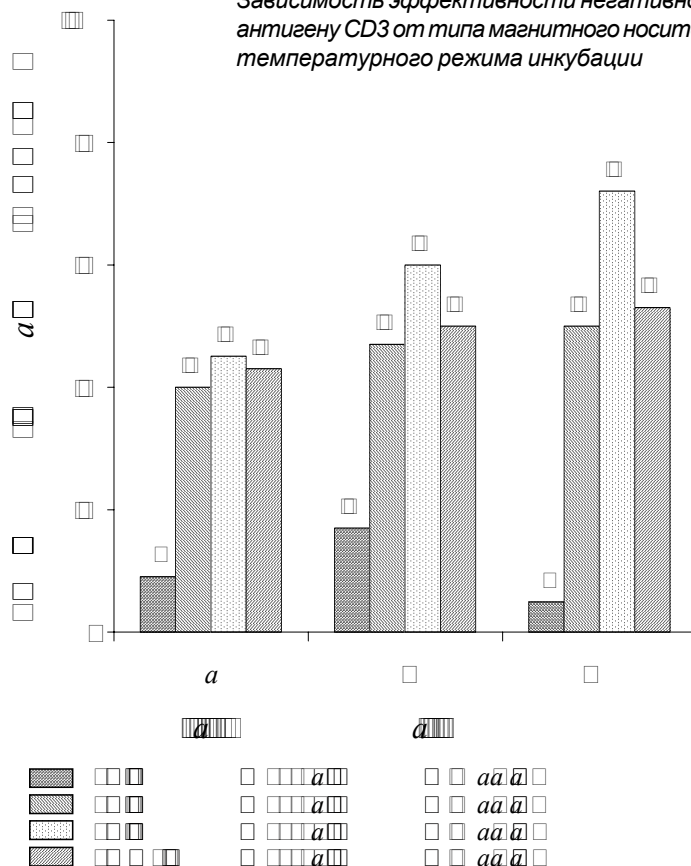
PBS с добавлением 0,5 % ЧСА и 0,1 % NaN_3 .

Непосредственно перед селекцией магнитные микросферы дважды отмывали рабочим раствором (2mM EDTA, 0,5 % ЧСА в 0,01M PBS (pH 7.4)), концентрируя в неоднородном магнитном поле. Исходные клетки (30×10^6) суспендировали в 3 мл того же раствора и добавляли к сконцентрированным в пластиковой пробирке частицам. Инкубацию проводили в течение 30 мин при медленной постоянной ротации. Температурные условия инкубации корректировались по мере получения результатов. Для разделения образец помещали в неоднородное магнитное поле постоянного магнита на 7 - 10 мин, концентрируя связавшиеся с частицами сорбента клетки (позитивная фракция) в виде узкой полосы на стенке пробирки, и осторожно отбирали супернатант (негативная фракция). Клетки позитивной фракции затем ресуспендировали в 0,01M PBS и вновь концентрировали в магнитном поле. Процедуру отмывки, необходимую для того, чтобы исключить вероятность случайного попадания в позитивную фракцию свободных клеток, проводили трижды. Для определения эффективности негативной селекции проводили фенотипирование клеток исходного образца и клеток, не связавшихся с частицами, иммунофлуоресцентным методом с последующей обработкой результатов на проточ-

ном цитофлуориметре (FACScan, Becton Dickinson).

Оценивая качество разделения, мы не только рассматривали уровень экспрессии антигена-мишени, но и анализировали изменение состава популяции, определяя долю В-лимфоцитов. При негативной селекции $\text{CD}3^+$ -клеток оценивали уровень экспрессии антигенов $\text{CD}4$ и $\text{CD}8$. При негативной селекции по антигену $\text{CD}8$ оценивали процент $\text{CD}4^+$ -клеток, сравнивая его с количеством $\text{CD}3^+$ Т-лимфоцитов в популяции. В первых экспериментах иммунофлуоресцентный анализ проводили методом прямого окрашивания клеток конъюгатами МКА с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) или фикоэритрином (PE). Однако полученные при селекции с использованием иммуномагнитных сорбентов против антигена $\text{CD}3$ результаты показали, что такой подход не вполне корректен. Хотя клетки негативной фракции окрашивались МКА анти- $\text{CD}3$ PE в слабой степени, что могло быть интерпретировано как результат почти 100 %-ного удаления клеток-мишеней, мы не обнаружили существенного увеличения доли В-лимфоцитов и уменьшения экспрессии антигенов $\text{CD}4$ и $\text{CD}8$. Предположив возможную блокаду антигенов-мишеней антителами, отщепившимися от магнитных частиц, в дальнейшем помимо окрашивания прямо мечеными антителами, анализировали окрашивание клеток конъюгата-

Рис. 1
Зависимость эффективности негативной селекции по антигену $\text{CD}3$ от типа магнитного носителя и температурного режима инкубации



a – инкубация при 22 °C a – инкубация при 37 °C a – инкубация при 37 °C

ми антивидовых (баран-анти-мышь) антител с FITC (F(ab)₂-FITC). Цитофлуорометрия таких проб позволяла выявлять в негативной фракции клетки-мишени, связавшиеся МКА, но не удаленные в процессе селекции.

Анализ результатов негативной селекции с использованием конъюгатов с МКА anti-CD3 показал, что на эффективность деплеции CD3⁺-клеток заметно влияют механизм иммобилизации иммуноглобулинов и температурный режим инкубации (рис. 1).

При проведении инкубации клеток с микросферами в условиях комнатной температуры (22°C) эффективность селекции составляла 9, 40, 45 и 43 % для конъюгатов А, В, С и D, соответственно. Столь невысокий уровень деплеции мог быть обусловлен отщеплением МКА от магнитных частиц при взаимодействии с антигеном. Кроме того, неблагоприятное влияние могло оказывать происходившее при инкубации слипание клеток с образованием крупных конгломератов. В отношении конъюгатов В, С и D первое предположение подтверждалось наличием в негативных фракциях большого количества CD3⁺ клеток, несущих на своей поверхности МКА. При использовании частиц на основе МПМ А низкая эффективность селекции, вероятно, была следствием недостаточного количества им-

мобилизованных антител. Снижение температуры инкубации до 13°C устраняло слипание клеток и частично предупреждало отрыв антител от магнитного носителя. Эффективность селекции при таких условиях для частиц В, С и D возросла до 47, 60 и 50 %, соответственно. Те же конъюгаты при проведении инкубации при температуре 4°C обеспечивали деплецию 50, 72 и 53 % CD3⁺-лимфоцитов (рис. 3). В случае конъюгата А максимальная эффективность селекции (17 %) была достигнута при температуре 13°C. При дальнейшем понижении температуры до 4°C уровень деплеции уменьшался до 5 %.

При тестировании конъюгатов с МКА анти-CD8 мы обнаружили, что значительное сокращение популяции антиген положительных клеток достигается при использовании всех четырех типов частиц (рис 2). Однако, так же как и в случае селекции CD3⁺-клеток, наиболее полным удаление было при использовании иммуномагнитного сорбента на основе МПМ С (87 %). Конъюгаты В и Д обеспечивали удаление 78 и 82 % CD8⁺-клеток, соответственно. При использовании конъюгата А эффективность селекции была наименьшей и не превышала 20 %. Снижение температуры инкубации до 13°C увеличивало эффективность селекции с использованием всех конъюгатов, кроме образца А (до 80, 96 и 86% для конъюга-

Рис. 2
Зависимость эффективности негативной селекции по антигену CD8 от типа магнитного носителя и температурного режима инкубации

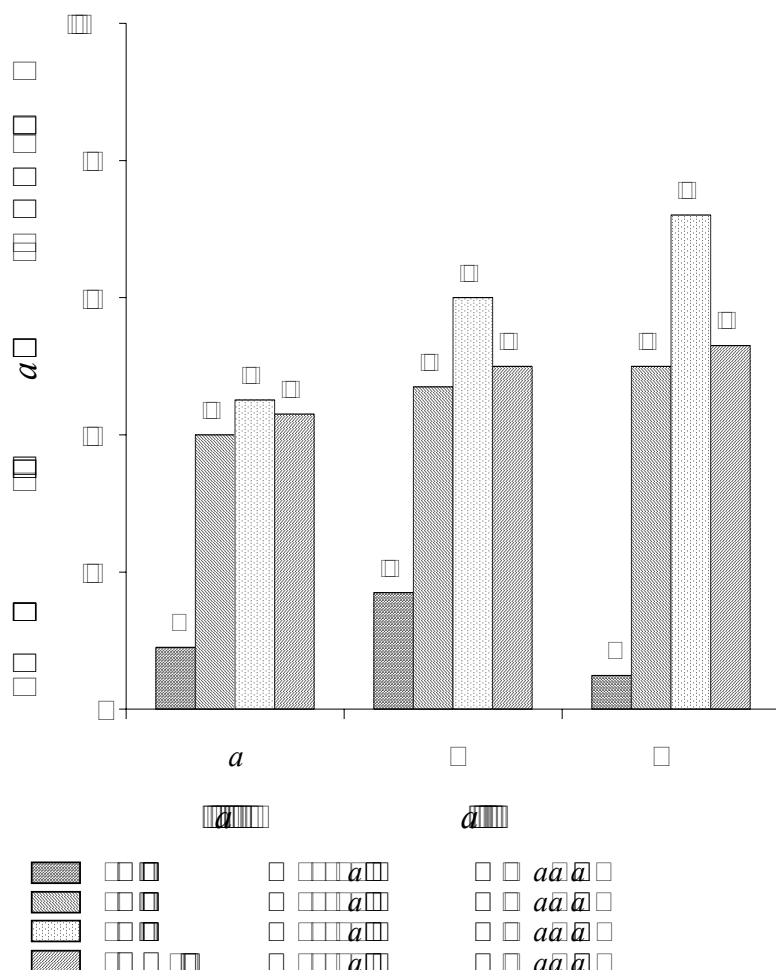
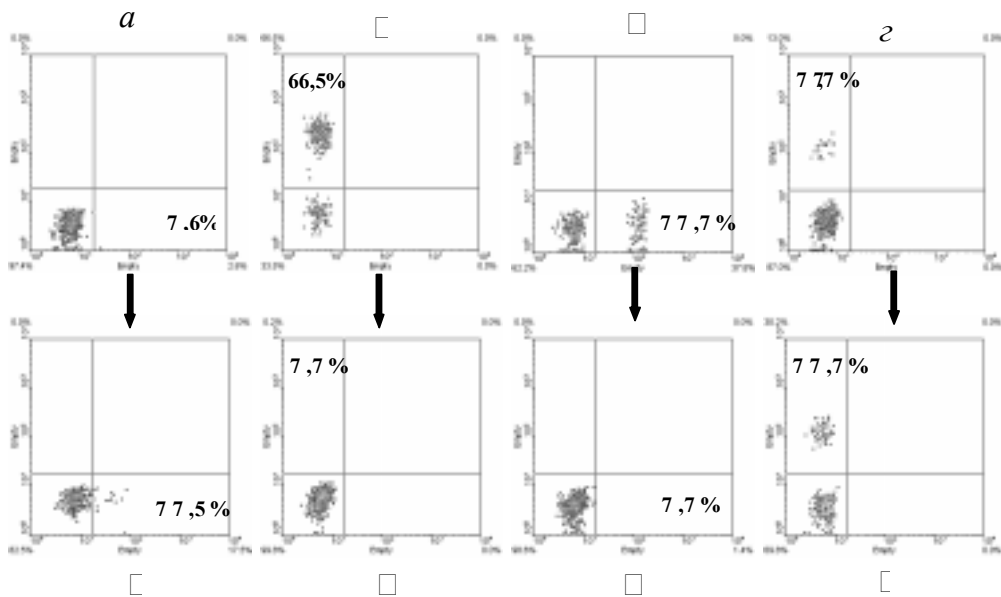


Рис. 3
Эффективность негативной селекции Т-лимфоцитов по антигену CD8

Рис. 4
Эффективность негативной селекции Т-лимфоцитов по антигену CD3

Селекцию проводили с использованием конъюгата антител типа С при температуре



в мерные программы иммунофлуоресценции мононуклеарных клеток периферической крови здорового донора до и после деплеции клеток

- а
- антител типа С
- антител типа С
- з

тов В, С и D, соответственно). Высокий уровень деплеции CD8⁺-субпопуляции Т-лимфоцитов подтверждался ростом экспрессии антигенов CD19 (общего антигена В-лимфоцитов), уменьшением общей популяции Т-лимфоцитов, которая после селекции на 93- 96 % состояла из CD4⁺CD8⁻ клеток (рис. 4). Дальнейшее понижение температуры инкубации до 4°C резко ухудшало качество селекции. Степень удаления клеток-мишеней в этих условиях не превышала 5, 26, 28 и 27% для сорбентов А, В, С и D. Следует отметить, что при проведении негативной селекции по антигену CD8 в негативной фракции не было выявлено значимого количества клеток, несущих на поверхности молекулы антител. Даже при инкубации с сорбентами А, В, С и D в условиях комнатной температуры количество связавшихся с МКА, но не удаленных клеток, составило 1,0; 4,6; 3,1 и 6,0 %.

Результаты экспериментов по негативной селекции Т-лимфоцитов по мембранным антигенам CD3 и CD8 позволяют утверждать, что оптимальной технологией получения иммуномагнитных конъюгатов является иммобилизация МКА по механизму ковалентного связывания с носителем, активированным избытком Ts-Cl. Различия в степени деплеции при селекции по антигенам CD3 и CD8 объясняются, скорее всего, особенностями самих антигенов. Можно предположить, что взаимодействие иммуноглобулина, иммобилизованного на магнитной матрице, с CD3-антигеном Т-лимфоцита либо вызывает изменение конформации молекулы МКА, либо сопровождается погружением МКА в толщу мембраны вследствие интернализации самого рецептора. Это приводит к разрыву связи между МКА и магнитным носителем и освобождению клетки-мишени, которая с этого момента становится «невидимой» для частиц сорбента. Стабилизации конъюгатов и, следовательно, повышению эффективности селекции, отчасти способствует понижение температуры. Однако, даже проводя инкубацию при 4°C, полного удаления CD3⁺-клеток достичь не удастся. Другой возможный подход к устранению возникшей проблемы заключается в создании так называемых «универсальных» конъюгатов, несущих на поверхности спейсерные участки для связывания МКА. Увеличение расстояния между молекулой антитела и поверхностью магнитной частицы должно способствовать сохранению связи между клеткой и микросферой при интернализации антигена. В настоящий момент начата работа по созданию таких конъюгатов и определению условий метода непрямо́й иммуномагнитной селекции. Был получен конъюгат на основе МПМ В и поликлональных антител барана против Fc-фрагментов IgG мыши. Для направленного разделения сорбент инкубировали с клетками, предварительно мечеными моноклональными антителами. Результаты первых экспериментов свидетельствуют об эффективности подхода при негативной селекции В-лимфоцитов по антигену CD20. Использованием полученного конъюгата в сочетании с МКА анти-CD3 удастся достичь удаления 87 % Т-лимфоцитов. Мы полагаем, что эффективность деплеции CD3⁺-клеток будет повышена дальнейшей оптимизацией условий селекции.

Выводы

1. Способность магнетитовых полистироловых микросфер связывать иммуноглобулины зависит от состава и химических свойств их поверхности. Механизмы неспецифической сорбции не обеспечивают связывания достаточного количества иммуноглобулинов. Модификация поверхности МПМ с формированием химических групп для ковалентного связывания протеинов заметно увеличивает емкость магнитного носителя, делая возможным иммобилизацию МКА в количестве, необходимом для образования поверхностного протеинового монослоя.

2. Механизм иммобилизации МКА на поверхности магнитного носителя оказывает существенное влияние на эффективность негативной селекции. Из исследованных типов сорбентов наиболее полное удаление клеток-мишеней обеспечивают конъюгаты на основе гидроксилорированных МПМ, активированных избытком Ts-Cl.

3. Фактором, влияющим на качество разделения, является температурный режим инкубации клеток с сорбентом. Оптимальная температура инкубации при негативной селекции составляет 13°C для антигена CD8 и 4°C для антигена CD3.

4. Негативная селекция с использованием конъюгатов типа С с МКА ICO-31 и anti-CD3 при оптимальном температурном режиме приводит к удалению 96 % CD8⁺-клеток и 69 % CD3⁺-клеток.

5. Низкая эффективность селекции CD3⁺-лимфоцитов при использовании магнитных конъюгатов с МКА, вероятно, обусловлена особенностями структуры и свойств самого антигена. Применение модифицированного метода ИМС с использованием «универсального» сорбента позволяет увеличить эффективность деплеции.

В результате проведенной работы были получены и охарактеризованы иммуномагнитные конъюгаты против мембранных антигенов CD3 и CD8, различающиеся механизмом иммобилизации МКА. Экспериментально показано, что наибольшую эффективность селекции обеспечивают магнитные носители на основе МПМ, активированных избытком п-толуолсульфонилхлорида. Негативная селекция приводит к удалению 96 % CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов при использовании конъюгата с МКА ICO-31, и сокращает долю популяции Т-клеток в целом на 72 % при использовании конъюгата анти-CD3. Начата работа по созданию «универсального» иммуномагнитного сорбента. Полученные на сегодняшний день результаты свидетельствуют об эффективности сепарации CD3⁺ и CD20⁺-клеток и позволяют надеяться на успешное завершение этого проекта.

Созданные иммуномагнитные конъюгаты могли бы стать удобным инструментом в дальнейшем поиске оптимального пути селекции клеток костного мозга и периферической крови доноров, предупреждающем развитие реакции «трансплантат-против-хозяина», но не влияющей на скорость восстановления гемопоэза. Предполагаемое клиническое использование полученных сорбентов связано с удалением иммунокомпетент-

ных клеток из аллогенных трансплантатов, а также с элиминацией опухолевых клеток из аутологичного материала перед трансплантацией больным В- и Т-клеточными лимфомами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иванов П.К. Моноклональные антитела в онкологии. // Автореф. дисс...докт. мед. наук., Москва, 2001.

2. Brockstein B., Ross A., Hollingsworth K. et al. Tumour cell contamination of bone marrow harvest products: clinical consequences in a cohort of advanced breast cancer patients undergoing high dose chemotherapy (HDS). // Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., 1995, 14, 327.

3. Chakraverty R., Robinson S., Peggs K. et al. Excessive T cell depletion of peripheral blood stem cells has an adverse effect upon outcome following allogeneic stem cell transplantation. // Bone Marrow Transplant, 2001, 28, № 9, p. 827-34.

4. Garderet L., Snell V., Przepiorka D. et al. Effective depletion of alloreactive lymphocytes from peripheral blood mononuclear preparations. // Transplantation, 1999, 67, № 1, p. 124-130.

5. Herrera C., Torres A., Garcia-Castellano J.M. et

al. Prevention of graft-versus-host disease in high risk patients by depletion of CD4+ and reduction of CD8+ lymphocytes in the marrow graft. // Bone Marrow Transplant, 1999, 23, № 5, p. 443-450.

6. Ogura M., Kagami Y., Suzuki R. et al. Phase I/II trial of cure-oriented high-dose chemoradiotherapy with transplantation of CD34+ peripheral blood cells purified by the immunomagnetic bead method for refractory hematological malignancies. // Cancer Chemother Pharmacol, 1997, 40 Suppl., p. 51-57.

7. Sao H., Kitaori K., Kasai M. et al. A new marrow T cell depletion method using anti-CD6 monoclonal antibody-conjugated magnetic beads and its clinical application for prevention of acute graft-vs.-host disease in allogeneic bone marrow transplantation: results of a phase I-II trial. // Int J Hematol 1999, 69, № 1, p. 27-35.

8. Servida F., Soligo D., Caneva L. et al., Functional and morphological characterization of immunomagnetically selected CD34+ hematopoietic progenitor cells. // Stem Cells, 1996, 14, № 4, 430-38.

9. Soiffer R.J., Weller E., Aliea E.P. et al. CD6+ donor marrow T-cell depletion as the sole form of graft-versus-host disease prophylaxis in patients undergoing allogeneic bone marrow transplant from unrelated donors. // J Clin Oncol, 2001, 19, № 4, p. 1152-1159.