



УДК 615.214:57.083.3

© 1993 Н. П. Данилова, А. Б. Дзгоев,  
Н. И. Бекман, Р. Г. Василев

## ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ФЕНОБАРБИТАЛУ

НПО «Биотехнология», Москва

Получены моноклональные антитела к противосудорожному лекарственному препарату фенобарбиталу. Гибридомы, продуцирующие антифенобарбитальные моноклональные антитела, получены слиянием селезеночных клеток мышей линии BALB/c, иммунизированных конъюгатом гемоцианин — фенобарбитал, с клетками миеломы P3-X63-Ag8.653. Три гибридных клон отобраны в непрямом твердофазном иммуноферментном методе. Антитела выделены из мышечных асцитных опухолей, очищены и проанализированы. Константа связывания антител 1A9, пригодных для использования в иммуноанализе, составляла  $1,6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ .

Современная терапия противосудорожным препаратом фенобарбиталом основывается на индивидуальном подборе доз для каждого пациента исходя из концентрации препарата в сыворотке крови. Для определения концентрации фенобарбитала используются в основном иммуноаналитические методы [1—3]. Качество этих методов можно резко повысить заменой поликлональных сывороток на моноклональные антитела. Преимущества моноклональных антител очевидны: они гомогенны, их можно нарабатывать в неограниченных количествах и использовать как стандартные иммунохимические реагенты. Кроме того, гибридная технология дает возможность получать моноклональные антитела с узкой специфичностью, способные отличать малейшие изменения в молекуле гаптена, что важно для иммуноанализа фенобарбитала, основной метаболит которого, *n*-гидроксифенобарбитал, отличается от исходного препарата только одной функциональной группой.

Целью данной работы было получение моноклональных антител к фенобарбиталу, пригодных для использования в иммуноанализе этого лекарственного вещества.

Высокоиммуногенный конъюгат фенобарбитала с белковым носителем Фб-азо-KLN синтезировали азосочетанием *m*-аминопроизводного фенобарбитала с гемоцианином из фиссуреллы (KLN) по известному методу [4].

Для получения моноклональных антител использовали мышей линии BALB/c. Первую инъекцию препарата проводили внутрибрюшинно или подкожно в несколько мест, титр антител к фенобарбиталу был выше при втором способе введения. Эффективность иммунизации повышалась также при увеличении интервала между первой и второй иммунизациями до 5—6 недель. Это наблюдение хорошо согласуется с результатами других авторов, исследовавших выход специфичных гибридом в зависимости от длины промежуточного интервала [5].

Сокращения: БСА — бычий сывороточный альбумин, KLN — гемоцианин из моллюска фиссуреллы, Фб — остаток фенобарбитала, Фб-азо-KLN и Фб-азо-БСА — конъюгаты фенобарбитала с KLN и БСА, полученные азосочетанием, Фб-г/а-БСА — конъюгат фенобарбитала с БСА, полученный с использованием глутарового альдегида, ИФА — иммуноферментный анализ.

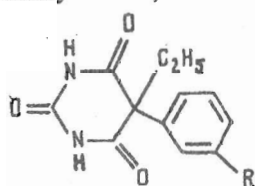
После второй иммунизации у всех животных брали кровь и сыворотки исследовали на присутствие антител, специфичных к гаптену. Отбирали животных с интенсивным иммунным ответом на фенобарбитал, поскольку при слиянии селезеночных клеток таких мышей вероятность получения гибридомы, продуцирующей высокоаффинные антитела, выше.

Сывороточный иммунный ответ оценивали в твердофазном ИФА. Антитела в мышинных сыворотках определяли до разведений 1:1000—1:50 000. Для экспериментов по слиянию брали животных с титром выше, чем 1:10 000.

Слияние и клонирование проводили общепринятыми методами, используя в качестве миеломного партнера клеточную линию P3-X63-Ag8.653, а в качестве сливающего агента — полиэтиленгликоль-4000 [6].

Ключевым этапом в получении гибридом является отбор положительных клонов. Молекула фенобарбитала неиммуногенна сама по себе, и для получения антител ее ковалентно связывают с иммуногенным носителем. Очевидно, что при иммунизации мышей конъюгатом фенобарбитала с белком образующиеся антитела будут направлены на комплексную антигенную детерминанту, включающую кроме самого гаптена связь между гаптенем и белком и прилегающий участок белка. Вклад этих компонентов в связывание будет различным в антителах разной специфичности. По-видимому, наибольшую ценность для иммуноанализа представляют те антитела, которые связываются только с гаптенем, но не взаимодействуют ни со связью гаптен—белок, ни с белковым компонентом, поскольку для таких антител наиболее вероятно отсутствие фоновых реакций. Именно эти антитела желательно выявить при отборе положительных клонов. Если для скрининга антител используется твердофазный ИФА, то для того, чтобы избежать помех со стороны гибридом, специфичных к белку-носителю и связанному, а не свободному гаптену, необходимо использовать в качестве антигена конъюгаты с белком-носителем, отличающимся от включенного в иммуноген. Мы в своей работе обычно применяем конъюгаты KLH—гаптен как иммуногены и конъюгаты БСА—гаптен как антигены в ИФА. Для того чтобы избежать помех со стороны антител, взаимодействующих со связью гаптен—белок, мы стараемся использовать для иммунизации и для ИФА конъюгаты, различающиеся как белками-носителями, так и типом химической связи.

Для отбора положительных клонов к фенобарбиталу был синтезирован конъюгат фенобарбитал—БСА, в котором фенобарбитал связан с носителем не азосвязью, как в иммуногене, а с помощью глутарового альдегида.



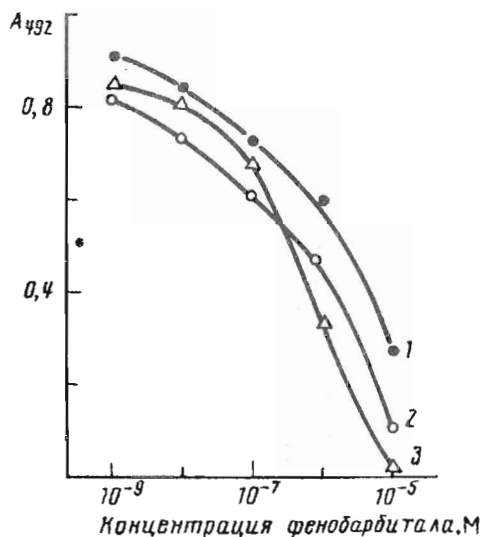
иммуноген Фб-азо-KLH: R —N=N—(KLH)

антиген для ИФА Фб-г/а-БСА: R —NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>NH—(БСА)

Скрининг антител проводили в две стадии: 1) выявляли антитела, которые связывались с сорбированным конъюгатом фенобарбитал—белок; положительным сигналом считался тот, который в ИФА превышал фон более чем в 10 раз; 2) определяли способность антител взаимодействовать со свободным фенобарбиталом; для этого ингибировали связывание антител с конъюгатом свободным фенобарбиталом в различных концентрациях. На первом этапе мы отобрали 11 антител, а по результатам ингибирования — 3 моноклональных антитела.

Специфичность этих антител изучалась в ИФА в экспериментах по ингибированию. Все антитела специфичны к фенобарбиталу (рисунок), но различаются по перекрестным реакциям с его аналогами и основным метаболитом фенобарбитала — *n*-гидроксифенобарбиталом (таблица). Все отобранные моноклональные антитела принадлежат к IgG2-субклассу: C2C6 к IgG2a, 1A9 и A5 к IgG2b.

Очевидно, что только антитела, которые не взаимодействуют перекрестно с метаболитами и аналогами лекарства, подходят для иммуноанализа. Поэтому



Ингибирование фенобарбиталом связывания моноклональных антител с конъюгатом Фб-г/а-БСА: 1 — клон 1А9, 2 — С2С6, 3 — А5

антифенобарбитальные антитела С2С6 и А5 не могут быть использованы для этой цели; они перекрестно реагируют с метаболитом фенобарбитала *n*-гидроксифенобарбиталом. Антитела 1А9 имеют небольшую перекрестную реакцию с *n*-гидроксифенобарбиталом и по своей специфичности подходят для использования в иммуноанализе.

Константа аффинности отобранных антител была измерена в поляризационном флуороиммуноанализе и для антител 1А9 составила  $1,6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$  [7].

Итак, были получены моноклональные антитела к лекарственному препарату фенобарбиталу, обладающие высокой аффинностью и специфичностью. На основе этих антител разработаны два иммуноаналитических метода определения фенобарбитала: иммуоферментный твердофазный [3] и метод, основанный на поляризации флуоресценции [7].

### Экспериментальная часть

В работе использованы гемоцианин из моллюска фиссуреллы, бычий сывороточный альбумин, адъювант Фрейнда, пероксидаза из хрена, антитела к мышинным иммуноглобулинам, меченные пероксидазой (Sigma, США); *o*-фенилендиамин (H-Roche, Швейцария); 96-луночные полистироловые планшеты (Nunc, Дания); DEAE-тоуорепарл 650M (Toyo Soda MFG, Япония); миелома P3-X63-Ag.653 (Институт цитологии РАН); лошадиная сыворотка, эмбриональная телячья сыворотка, культуральная среда RPMI 1640, селективные среды НАТ и НТ и другие реактивы для проведения работ с культурами клеток (Flow, Великобритания); полиэтиленгликоль-4000 (Merck, Германия), азид натрия, твин-20, глутаровый альдегид, боргидрид натрия (Sigma, США), фенобарбитал (Merck, Германия).

**Получение гаптен-белковых конъюгатов.** *m*-Аминофенобарбитал синтезировали нитрованием фенобарбитала азотной кислотой и последующим восстановлением 5-этил-5-нитрофенилбарбитуровой кислоты водородом в присутствии палладия на угле [8]. Конъюгат фенобарбитала Фб-азо-КЛН получали реакцией диазониевой соли *m*-аминофенобарбитала с белком-носителем по известному методу [4]. Содержание гаптена в этом конъюгате было определено по УФ-спектру и составляло 230 моль гаптена на 1 моль белка. Фб-г/а-БСА синтезировали, добавляя к смеси 30 мг *m*-аминофенобарбитала в 50 мкл диметилформамида и

Специфичность моноклональных антител к фенобарбиталу

Аналог	Перекрестные реакции, %*		
	1A9	C2C6	A5
Фенобарбитал	100	100	100
<i>n</i> -Гидроксифенобарбитал	11	120	50
Гексобарбитал	<0,01	<0,01	<0,01
Барбитал	0,1	0,1	5
Пентобарбитал	5	20	10
Секобарбитал	<0,1	<0,1	<0,1

\* Процент перекрестных реакций — молярное соотношение концентраций гаптена и аналога, дающих 50% ингибирование связывания антител.

90 мг БСА в 12 мл физиологического раствора, забуференного до pH 7,4 (ЗФР), по каплям в течение 30 мин 80 мкл 25% глутарового альдегида. После инкубации при перемешивании в течение 2 ч реакционную смесь диализовали против ЗФР. Затем добавляли 4 мг NaBH<sub>4</sub> и смесь инкубировали 3 ч при 20° С. После диализа против воды конъюгат лиофилизовали. Полученный конъюгат содержал 19 моль гаптена на 1 моль белка.

**Иммунизация.** Мышей BALB/c иммунизировали внутривенно и подкожно 0,2 мл эмульсии, состоящей из смеси полного адьюванта Фрейнда и раствора, содержащего 0,1 мг конъюгата Фб-азо-KLN, в ЗФР (2:1). Через 6 нед проводили повторную иммунизацию раствором антигена с неполным адьювантом и на 7-е сут у мышей брали кровь из ретроорбитального синуса для обнаружения антител к гаптenu. Анализ проводили методом твердофазного ИФА, как описано ниже. Далее мыши получали инъекции антигена в неполном адьюванте 1 раз в месяц в течение 5 месяцев. Не раньше чем через 3 нед после последней иммунизации мышам с наиболее высоким иммунным ответом вводили по 100 мкг антигена в ЗФР и 3 сут позже было проведено слияние.

**Получение гибридом.** Для слияния использовали клетки мышинной несекретирующей миеломы P3-X63-Ag8.653. Клетки культивировали в среде RPMI-1640, дополненной 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Спленоциты сливали с миеломными клетками в соотношении 1:1 с использованием 50% полиэтиленгликоля-4000. После слияния клетки суспендировали в селективной среде, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин, и помещали в 96-луночные планшеты, содержащие фиддерный слой мышинных перитонеальных макрофагов с плотностью  $2 \cdot 10^5$  клеток на лунку. Свежую среду НАТ добавляли в лунки каждые 3 дня. Образовавшиеся клоны проверяли на продукцию антител к гаптenu твердофазным ИФА, описанным ниже. Положительные клоны клонировали методом лимитирующих разведений и наращивали в виде асцитов в мышак BALB/c.

**Определение антител.** Конъюгаты фенобарбитала с БСА сорбировали на планшетах для микротитрования в концентрации 1 мкг/мл в 0,05 М натрий-карбонат-бикарбонатном буфере, pH 9,6, 2 ч при комнатной температуре и 12 ч при 4° С. Планшеты промывали водой, инкубировали 30 мин с 0,1% БСА в ЗФР, промывали и высушивали. Для определения титра антител в сыворотках готовили 10-кратные разведения сывороток в лунках планшета в буфере для анализа (ЗФР, дополненный 0,2% БСА и 0,05% твин-20) в объеме 100 мкл на лунку. Планшеты инкубировали 1 ч при комнатной температуре, промывали, инкубировали 45 мин с кроличьими антителами к мышинным IgG, конъюгированными с пероксидазой хрена в том же буфере, и промывали. Ферментативную активность определяли с помощью реакции с *o*-фенилендиамином — перекисью водорода (4 мг ортофенилендиамина и 4 мкл 33% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на 10 мл 0,1 М



натрий-цитрат-фосфатного буфера). Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 10%  $H_2SO_4$  и измерение величин оптического поглощения производили при 492 нм. Для скрининга моноклональных антител 50 мкл клеточного супернатанта добавляли в лунки, содержащие 50 мкл буфера для анализа, реакцию инкубировали 1 ч при комнатной температуре и заканчивали как описано выше. В качестве контроля использовали сыворотку иммунной мыши в разведении 1:200.

Определение изотипов тяжелых цепей проводили в ИФА с использованием соответствующего набора (Miles Lab, США).

**Определение специфичности антител.** Перекрестные реакции антител к фенобарбиталу с его аналогами оценивали по ингибированию связывания антител с иммобилизованным антигеном фенобарбитал—белок. Исходные растворы веществ готовили в 0,01 М NaOH. В планшете для микротитрования готовили разведения гаптена или его аналогов от  $10^{-5}$  до  $10^{-9}$  М в буфере для анализа. К 50 мкл этих растворов добавляли по 50 мкл супернатантов от положительных клонов в разведении 1:10, и после 18 ч инкубации при 4° С анализ был закончен как описано выше.

**Выделение антител.** Моноклональные антитела из асцитной жидкости были очищены монообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе в 0,01 М фосфатном буфере, pH 8, в градиенте NaCl от 0 до 0,5 М. Антитела гомогенны по данным электрофореза в полиакриламидном геле.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chung A., Kim S. Y., Cheng L. T., Castro A. // *Experientia*. 1973. V. 29. P. 820—821.
2. Cerreta K. V., Flynn E. J., Spector S. // *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1977. V. 7. № 3. P. 203—206.
3. Дзгоев А. Б., Еремин С. А., Данилова Н. П., Карнов М. В., Васильев Р. Г. // *Клиническая лабораторная диагностика*. 1992. № 11. С. 13—16.
4. Satoh H., Kuroiwa Y., Hamada A. // *J. Biochem.* 1973. V. 73. P. 1115—1118.
5. Shieber O., Hampton S. M., Marks V. // *J. Immunol. Meth.* 1988. V. 114. P. 49—52.
6. Danilova N. P., Vasilov R. G. // *Immunol. Letters*. 1991. V. 28. P. 79—84.
7. Дзгоев А. Б., Еремин С. А., Данилова Н. П., Егоров А. М., Васильев Р. Г. // *Вопр. мед. химии*. 1991. Т. 37. № 3. С. 85—86.
8. Maynert E. W., Washburn E. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1953. V. 75. № 3. P. 700—704.

Поступила в редакцию  
13.IV.1993

*N. P. Danilova, A. B. Dzгоеv, N. I. Beckman,  
R. G. Vasilov*

#### PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST PHENOBARBITAL

*NPO «Biotechnologia», Moscow*

Monoclonal antibodies to phenobarbital have been developed. Spleen cells of BALB/c mouse immunized with conjugate keyhole limpet haemocyanin and phenobarbital were fused with P3-X63-Ag8.653 mouse myeloma cells. Three monoclonal antibodies, selected by indirect ELISA, were produced in mouse ascite fluids, purified and analyzed. Antibody IA9 was selected for use in immunoassay, its association constant being  $1,6 \cdot 10^9 M^{-1}$ .