



УДК 577.175.444.083.3

© 1993 Н. П. Данилова, Н. В. Крупина,  
М. В. Мерц, Р. Г. Василев

## ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ТИРОКСИНУ

*НПО «Биотехнология», Москва*

Моноклональные антитела к тироксину получены слиянием селезеночных клеток мышей, иммунизированных конъюгатом гемоцианина с тироксином, с клетками мышьяковой миеломной линии P3-X63-Ag8.653. Четыре моноклональных антитела отобраны непрямым иммуноферментным методом и частично охарактеризованы. Для использования в иммуноанализе выбраны антитела 1В7. Они получены в мышьяковых асцитных опухолях, очищены и проанализированы. Антитела принадлежат к подклассу IgG1. Их перекрестная реактивность по отношению к триодтирону менее 1%. Константа связывания антител  $3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ .

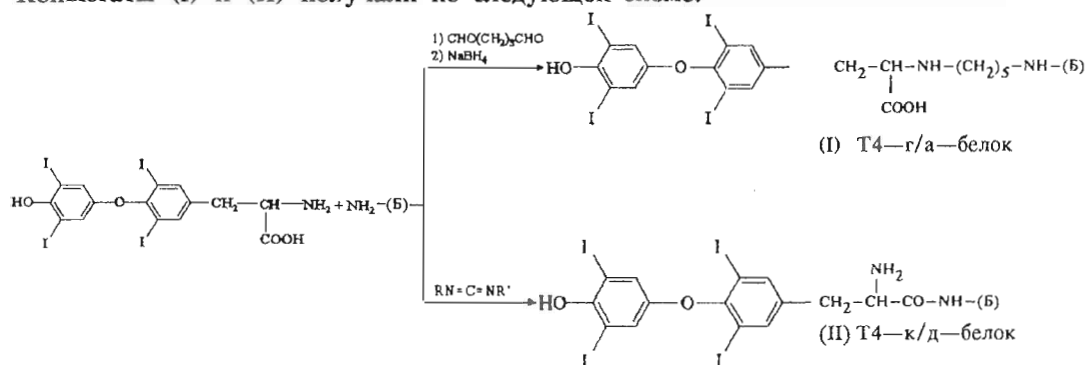
Большинство иммуноаналитических методов определения тироксина разработано на поликлональных сыворотках [1—3]. Как правило, особых проблем с их специфичностью не возникает. Однако многие сыворотки имеют относительно низкий титр и константу связывания, что несколько ограничивает их пригодность для использования в иммуноанализе, особенно при измерении свободного гормона. Низкий титр антисывороток может объясняться наличием у иммунизированных животных эндогенного тироксина. Часть связывающих центров на наиболее аффинных антителах тогда окажется занятой эндогенным тироксином. Это обычная проблема при получении антител к эндогенным соединениям, и ее можно успешно преодолеть только с переходом на использование в иммуноанализе моноклональных антител. Моноклональные антитела к тироксину были получены в нескольких лабораториях [4, 5], константы связывания для наиболее аффинных антител составляли  $1,96 \cdot 10^9$  и  $2,6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ .

Моноклональные антитела, которые мы стремились получить, должны были обладать высокой аффинностью, хорошей специфичностью и быть относительно индифферентными к различным блокирующим агентам, в особенности к 8-анилино-1-нафталинсульфокислоте, которая обычно используется в иммуноанализе тироксина.

Для получения моноклональных антител к тироксину необходимо решить несколько задач, прежде всего выбрать способ синтеза конъюгата тироксин — белок, обеспечивающий получение максимально интенсивного иммунного ответа на гаптен. Известно, что характер иммунного ответа на гаптен определяется как свойствами белка-носителя, так и типом химической связи гаптен — белок. В качестве белков-носителей мы использовали бычий сывороточный альбумин (БСА) и гемоцианин (КЛН). Ковалентное связывание тироксина с белком осу-

Сокращения: МкАТ — моноклональные антитела, БСА — бычий сывороточный альбумин, КЛН — гемоцианин из моллюска фиссуреллы, Т4 — тироксин, Т3 — триодтиронин, Т4—г/а—КЛН и Т4—к/д—КЛН — конъюгаты Т4 с КЛН с использованием глутарового альдегида и карбодимида, Т4—к/д—БСА и Т4—г/а—БСА — конъюгаты Т4 с БСА с использованием карбодимида и глутарового альдегида, АНС — 8-анилино-1-нафталинсульфокислота.

ществляли с помощью глutarового альдегида и водорастворимого карбодимида. Конъюгаты (I) и (II) получали по следующей схеме:



(Б) — белок, R —  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ , R' —  $-(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_2$ .

Влияние типа иммуногена на аффинность и специфичность образующихся антител изучали на кроликах и мышах. Поскольку известно, что гемоцианин является более иммуногенным носителем, чем БСА, для иммунизации животных использовали только конъюгаты T4—г/а—KLH и T4—к/д—KLH.

Иммунный ответ у животных оценивали методом твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА). В качестве антигена в ИФА использовали конъюгаты T4—к/д—БСА или T4—г/а—БСА. Определялся титр антисыворотки и оценивалась аффинность в реакции ингибирования свободным тироксином связывания антител с конъюгатом тироксин—белок. Оказалось, что максимальный иммунный ответ наблюдался у кроликов, иммунизированных конъюгатом T4—г/а—KLH. Сыворотки всех кроликов, иммунизированных этим конъюгатом, титровались гораздо выше в ИФА (титр 1 : 30 000—1 : 50 000), чем сыворотки кроликов, иммунизированных конъюгатом T4—к/д—KLH (титр 1 : 2000—1 : 3000), даже если в ИФА в качестве антигена использовали конъюгат T4—к/д—БСА, сходный по структуре с иммуногеном T4—к/д—KLH.

Для усиления иммунного ответа на тироксин применяли длительную схему иммунизации с большим (не менее 6 недель) интервалом между первой и второй иммунизациями и последующими инъекциями иммуногена раз в месяц в течение 5—8 месяцев. Эффективность подобной схемы не раз подтверждалась нами в опытах с другими гаптенами. Аффинность сравнивали по кривым ингибирования в ИФА связывания с иммобилизованным антигеном антисывороток от кролика, иммунизированного конъюгатом T4—г/а—KLH. Кровь у кролика брали после второй иммунизации (7 недель) и после пятой (30 недель). Оказалось, что концентрация тироксина, вызывающая 50% торможение связывания антител с иммобилизованным антигеном, в 8 раз меньше для 30-недельной антисыворотки.

Поскольку иммунный ответ может быть неодинаковым даже в популяции генетически однородных животных, для гибридизации выбирали мышей с максимальным иммунным ответом. Для этого после второй иммунизации у животных брали кровь и определяли титр антител в сыворотках в твердофазном ИФА. Мыши очень гетерогенны по иммунному ответу на тироксин (рис. 1). Эта гетерогенность может зависеть как от того, с какими иммуногенами встречалось животное в процессе своего индивидуального развития, так и от его тироидного статуса. Особенно интересно, что мыши различались не только титром антисыворотки, но и специфичностью образующихся антител (рис. 2).

Слияние и клонирование клеток проводили общепринятыми методами, как описано ранее [6]. В качестве миеломного партнера использовали клеточную

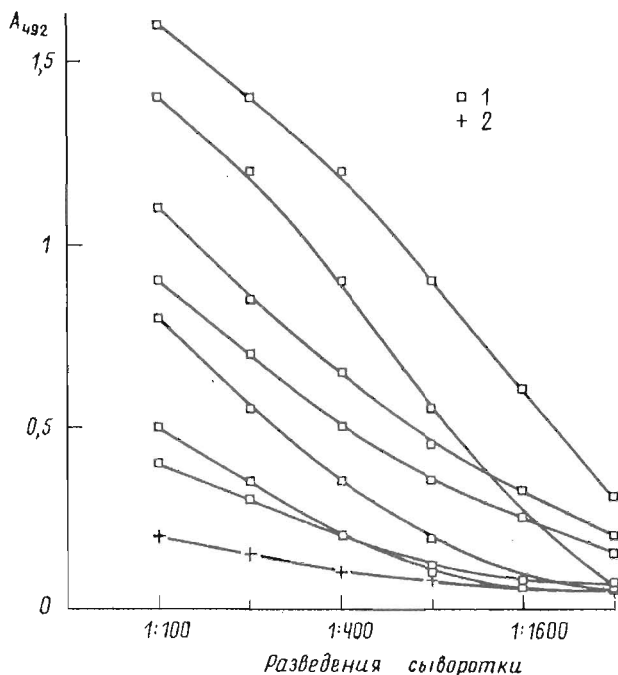


Рис. 1. Гетерогенность иммунного ответа на тироксин в выборке мышей BALB/c. 1 — сыворотка иммунизированных мышей, 2 — контрольная сыворотка

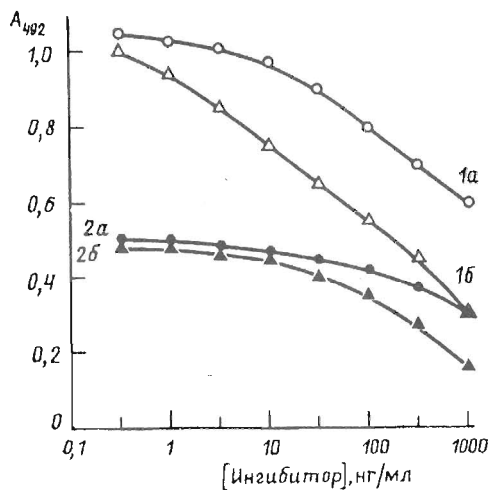


Рис. 2. Специфичность иммунного ответа на тироксин у мышей. Ингибирование тироксином (1б, 2б) и триодитионином (1а, 2а) связывания антител из сывороток мышей под номерами 1 и 2

линию P3-X63-Ag8.653, а в качестве сливающего агента — полиэтиленгликоль 4000. В одной гибридизации образовывалось около 400 клонов.

Ключевым этапом в получении гибридом является отбор положительных клонов. Для этого можно использовать различные методы. Твердофазный ИФА представляется наиболее простым методом, однако его можно использовать только при соблюдении определенных условий. Так, для того чтобы отобрать МкАТ,

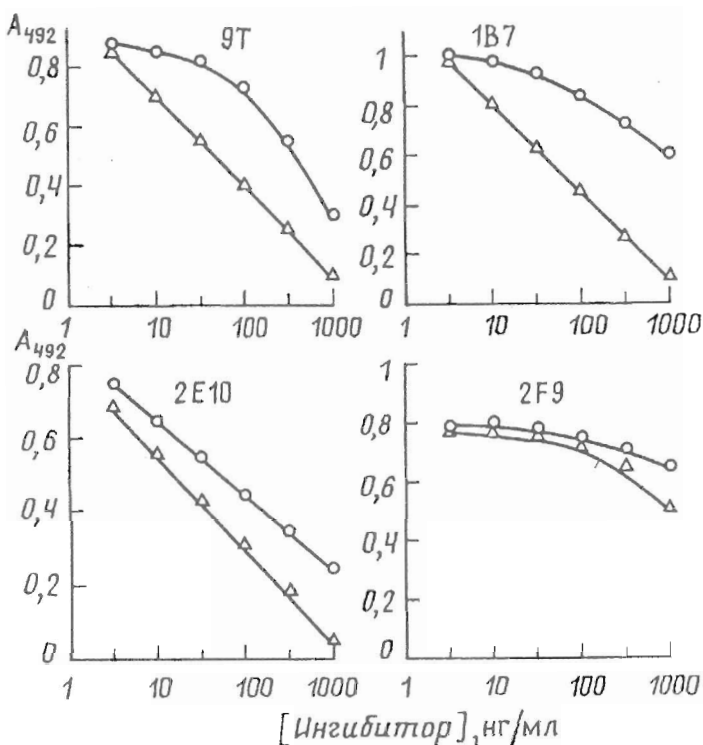


Рис. 3 Специфичность антитироксиновых моноклональных антител. Ингибирование связывания антител тироксином (Δ) и триодтиронином (○)

принадлежащие только к классу IgG, необходимо применять для отбора положительных гибридом меченые антивидовые антитела, полученные к IgG мыши. Чтобы избежать помех со стороны гибридом, специфичных к белку-носителю и связанному, а не свободному гаптену, необходимо использовать для скрининга конъюгат гаптена с белком-носителем, отличающийся от использованного для иммунизации не только характером белка, но и типом химической связи гаптен—белок [7]. Мы решили применить для скрининга конъюгат Т4—к/д—БСА, использовавшийся нами для тестирования поликлональных антител. Отбор клонов гибридом, секретирующих антитела к тироксину, проводили в две стадии. На первой стадии отбирали клетки, продуцирующие антитела, которые связывались с конъюгатом Т4—к/д—БСА, сорбированным на твердой фазе, так что в ИФА наблюдалось не менее чем четырехкратное превышение над фоном. Таким образом было отобрано 29 положительных клонов из 400. На втором этапе переклонированные гибридные клеточные линии наращивали в культуре и антитела тестировали на способность взаимодействовать непосредственно с тироксином. Сродство антител к тироксину определяли по ингибированию связывания антител с иммобилизованным антигеном в присутствии свободного тироксина. Было отобрано 6 клонов, активно секретирующих антитела к тироксину. У остальных антител, хотя они и активно связывались с иммобилизованным конъюгатом, связывание или плохо тормозилось свободным тироксином, или же на низких концентрациях появлялось усиление связывания («hook»-эффект). По-видимому, для эффективного взаимодействия связывающих центров этих антител с тироксином необходимо также присутствие участка белковой молекулы.

Специфичность полученных антител изучали твердофазным ИФА по ингибированию триодтиронином связывания антител с иммобилизованным антигеном. По данным этих экспериментов были построены кривые ингибирования и про-

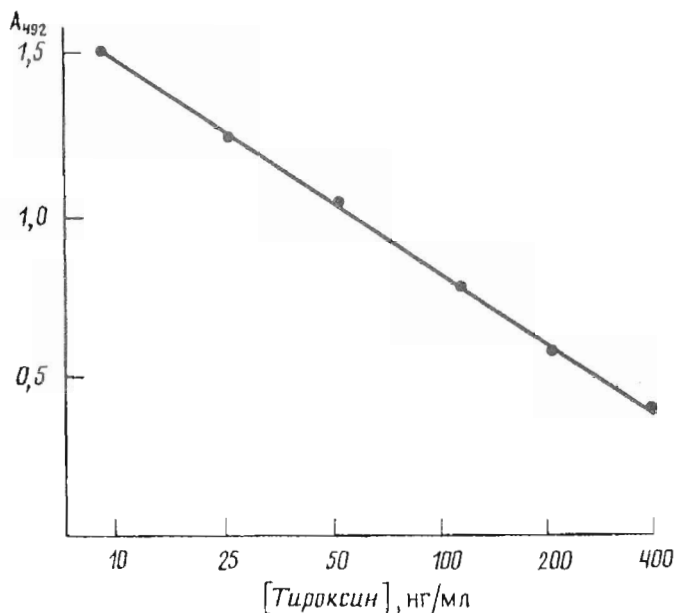


Рис. 4. Калибровочная кривая для определения тироксина в твердофазном ИФА

ведено их сравнение с аналогичной кривой для тироксина. Как видно из представленных на рис. 3 данных по четырем наиболее аффинным антителам 9Т, 1В7, 2Е10, 2F9, все антитела хорошо связываются с тироксином, но сильно различаются по сродству к триодтироину. Наиболее специфичны антитела 1В7: перекрестная реакция с триодтироином составляет 1% от реакции с тироксином.

Гибридома, продуцирующая эти моноклональные антитела, хорошо росла в асцитных опухолях. Антитела выделяли из асцитов ионообменной хроматографией. По данным гель-электрофореза, в асците содержался только один тип антител. Антитела 1В7 принадлежат к подклассу IgG1.

Для создания иммуноаналитических методов крайне важной характеристикой антител является их аффинность. Чем она выше, тем больше возможностей для конструирования иммуноаналитических систем при определении гаптена. В твердофазном иммуноанализе могут эффективно использоваться только антитела с константой аффинности более  $10^8 \text{ M}^{-1}$ . Константа аффинности антител, продуцируемых гибридомой 1В7, была определена твердофазным ИФА по методу, описанному Beatty [8]. Она равна  $3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ , что несколько выше значений  $K_{\text{af}}$  для моноклональных антител, описанных ранее [4, 5].

На следующем этапе работы были изучены возможности использования полученных антител в иммуноанализе тироксина.

Основная трудность анализа тироидных гормонов заключается в том, что большая их часть находится в связанном состоянии с тироксинсвязывающими белками. Чтобы измерять общее содержание тироксина в сыворотке, он должен быть вытеснен из этих белков. Для этого применяют различные агенты, например салицилаты, веронал-мединаловый буфер. Иногда для разрушения комплексов тироксина со связывающими белками используют высокие значения рН, но наиболее употребима, по-видимому, АНС. Поэтому крайне важно было исследовать влияние АНС на связывание антител с антигеном. Это изучалось в варианте непрямого конкурентного твердофазного анализа, в котором измерение основано на конкуренции гаптена из пробы и иммобилизованного гаптена за связывание с антителами, мечеными ферментом. Для разработки такого анализа тироксина моноклональные антитироксиновые антитела были выделены из асцитов

и конъюгированы с пероксидазой хрена. Конъюгированный антиген Т4—к/д—БСА был иммобилизован на твердую фазу (планшеты). Для изучения влияния АНС на связывание антител с антигеном АНС раститровывали в интервале 0,01—0,08% и смешивали с антителами в разведении, соответствующем 50% связыванию. Оказалось, что АНС до довольно высокой концентрации (0,05%) не влияла на связывание антител с антигеном. Калибровочная кривая, полученная для измерения тироксина, была линейна в логарифмических координатах при концентрациях тироксина 10—400 нг/мл (см. рис. 4).

Таким образом, нами получены высокоаффинные и специфичные моноклональные антитела к тироксину, которые пригодны для иммуноанализа тироксина.

### Экспериментальная часть

В работе были использованы тироксин, триодтиронин, гемоцианин из моллюска фиссуреллы, бычий сывороточный альбумин, адъювант Фрейнда, пероксидаза из хрена, антитела к кроличьим иммуноглобулинам, меченные пероксидазой (Sigma, США); человеческий сывороточный альбумин (Reanal, Венгрия); *o*-фенилендиамин (H-Roche, Швейцария); сефароза 4В (DAKOPATTS, Дания); акриламид, метиленабисакриламид, трис, глицин, TEMED, персульфат аммония, кумасси R-250 (Bio-Rad, США); 96-луночные полистироловые планшеты (Nunc, Дания); DEAE-Toyopearl 650M (Toyo Soda MFG, Япония); миелома P3-X63-Ag.653 (Институт цитологии РАН); лошадиная сыворотка, эмбриональная телячья сыворотка, культуральная среда RPMI 1640, селективные среды NAT и NT и другие реактивы для проведения работ с культурами клеток (Flow, Великобритания); азид натрия, твин-20, глутаровый альдегид, боргидрид натрия, гидрохлорид 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида, 8-анилино-1-нафталинсульфокислота (Sigma, США).

*Получение конъюгированных антигенов тироксина с белками-носителями Т4—г/а—KLH.* Раствор 1 мг тироксина в 0,05 М NaOH смешивали с 1 мг KLH в 1 мл воды. Добавляли при перемешивании 26 мкл 25% глутарового альдегида и инкубировали 12 ч при 4° С. Добавляли 0,1 мг NaBH<sub>4</sub> в 50 мкл воды, инкубировали 1 ч и диализовали против воды. По данным спектрофотометрического анализа, конъюгат содержал 120 моль тироксина на 1 моль белка.

*Т4—к/д—БСА.* Раствор 1 мг тироксина в смеси 0,5 мл DMSO и 0,5 мл воды смешивали с 1 мг БСА в 0,5 мл воды и добавляли к смеси при перемешивании 3 мг гидрохлорида 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида. Реакционную смесь инкубировали 12 ч при 4° С и диализовали против воды. Конъюгат содержал 17 моль тироксина на 1 моль белка (по данным спектрофотометрии).

*Т4—к/д—KLH* получали аналогично Т4—к/д—БСА.

*Кроликов и мышей иммунизировали* подкожно в несколько мест конъюгированным антигеном Т4—KLH (соответственно 0,4 и 0,1 мг на одно животное в эмульсии, состоящей из смеси (2 : 1) полного адъюванта Фрейнда и ЗФР (физиологический раствор, забуференный фосфатами до pH 7,4). Через 6 недель проводили повторную иммунизацию раствором антигена с неполным адъювантом и далее с интервалом 4 недели. На 7-е сут после иммунизации у животных отбирали кровь для обнаружения антител к тироксину.

*Определение антител к тироксину в сыворотках в твердофазном ИФА.* Антиген Т4—белок в 0,05 М натрий-карбонат-бикарбонатном буфере (pH 9,6) в концентрации 2 мкг/мл инкубировали в полистироловых 96-луночных планшетах по 120 мкл на лунку 2 ч при 20° С или в течение ночи при 4° С. Затем твердую фазу отмывали водой и инкубировали 30 мин с 0,1% раствором желатинины или 1% БСА в ЗФР. После этого планшет отмывали водой и высушивали.

В лунках планшета с сорбированным антигеном Т4—белок готовили 10-кратные разведения иммунной сыворотки по 100 мкл на лунку в 0,01 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 0,15 М NaCl, 0,05% твин-20 и 0,2% БСА (буфер

для анализа). Планшеты инкубировали 1 ч при 20° С, промывали и инкубировали 45 мин с раствором меченных пероксидазой хрена антител, обладающих видовой специфичностью к анализируемым антителам, по 100 мкл на лунку. После этого планшет промывали водой и определяли ферментативную активность, добавляя в лунки по 100 мкл раствора субстрата (4 мг о-фенилендиамина и 4 мкл 30% перекиси водорода на 10 мл 0,1 М натрий-цитратного буфера, рН 5). Через 5—10 мин реакцию останавливали добавлением в планшеты по 100 мкл 10% серной кислоты и измеряли поглощение при 492 нм. Из полученных данных определяли титр антител и разведение антител, при котором наблюдалось 50% связывание с иммобилизованным антигеном.

*Получение МкАТ к тироксину.* В работе использовали мышиную миеломную линию Р3-Х63-Аg.653. Миеломные и гибридные клетки культивировали в среде RPMI 1640, содержащей  $5 \cdot 10^{-5}$  М 2-меркаптоэтанол и 2 мМ глутамин и дополненной 10% эмбриональной телячьей сыворотки.

Мышам, отобраным для гибридизации, не ранее чем через 3 недели после последней иммунизации вводили по 100 мкг антигена в физиологическом растворе внутривенно. Спустя 2—3 сут у мышей асептически удаляли селезенку и гибридизовали спленоциты и миелому с помощью 50% полиэтиленгликоля 4000 [6]. Через 10 сут надосадочные жидкости из лунок, содержащих активно растущие клоны, проверяли на наличие антител к гаптену.

*Первичный скрининг клонов* проводили следующим образом: в лунки планшета с антигеном Т4—к/д—БСА помещали по 50 мкл буфера для анализа и добавляли по 50 мкл супернатанта от растущего клона. В качестве положительного контроля в одну из лунок помещали 50 мкл иммунной мышинной сыворотки в разведении 1 : 200, в качестве отрицательного контроля — культуральную среду. Планшеты инкубировали 1 ч при 20° С, а инкубирование с конъюгатом (антивидовые антитела/пероксидаза хрена) и ферментативную реакцию проводили как описано выше.

*Вторичный скрининг:* 50 мкл супернатантов, которые показали высокое связывание с сорбированным антигеном, помещали в лунки планшета с антигеном. В половину лунок добавляли по 50 мкл буфера для анализа, в другую половину — по 50 мкл раствора тироксина в концентрации 500 нг/мл в том же буфере. Далее инкубацию, реакцию с конъюгатом и ферментативную реакцию проводили аналогично первичному скринингу.

Отобранные положительные клоны дважды клонировали методом лимитирующих разведений. Часть клеток замораживали в среде, содержащей 50% лошадиной сыворотки и 15% DMSO.

Для наращивания гибридом в асцитах  $3 \cdot 10^6$  гибридных клеток в бессывороточной среде вводили внутривенно мышам BALB/с, которые предварительно (за 5—7 сут) получали инъекцию 0,5 мл пристана. После появления асцитных опухолей отбирали асцитные жидкости, клетки отделяли центрифугированием, асциты объединяли в пул, который хранили при —70° С до дальнейшего использования.

*Выделение МкАТ к тироксину ионообменной хроматографией.* К 1 мл асцита добавляли 1 мл насыщенного сульфата аммония и после 30 мин инкубации при 4° С смесь центрифугировали для отделения осадка. Осадок растворяли в 0,5 мл воды и диализовали против 0,01 М фосфатного буфера, рН 8,0. Затем раствор антител наносили на колонку с DEAE-Toyopearl, уравновешенную тем же буфером, и элюировали в градиенте концентрации хлористого натрия (0—0,5 М). Антитела диализовали против ЗФР, концентрировали до 2—10 мг/мл и хранили с добавлением 0,01% азида натрия при 4° С. Чистоту полученных антител контролировали с помощью гель-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия с использованием 5% концентрирующего геля и 10% разделяющего геля. Гель окрашивали 0,1% раствором кумасси R-250 в 50% метаноле и 10% уксусной кислоте.



*Характеристика моноклональных антител.* Аффинность антител определяли в ИФА [8]. В лунках планшета сорбировали антиген в концентрациях, недостаточных для насыщения твердой фазы (0,25 и 0,0625 мкг/мл). Очищенные антитела в известной концентрации раститровывали, инкубировали 24 ч при 4° С и планшет обрабатывали вторыми антителами как описано выше. Из кривых разведения определяли концентрации антител, соответствующие 50% насыщению. Константа аффинности определялась по формуле

$$K_{аф} = 1/2(2[Ab^*] - [Ab]),$$

где  $[Ab^*]$  и  $[Ab]$  — концентрации антител.

Подкласс антител определяли с помощью набора фирмы Дасо в соответствии с инструкцией.

Для определения специфичности антител методом твердофазного ИФА готовили разведения тироксина и триодтиронина в буфере для анализа в концентрациях от  $10^{-10}$  до  $10^{-6}$  М. В лунках планшета с сорбированным антигеном эти растворы смешивали с равными объемами раствора антител в разведении, соответствующем 50% от насыщения, инкубировали 24 ч при 4° С. Реакцию с конъюгатом (антивидовые антитела/пероксидаза хрена) и ферментативную реакцию проводили как описано выше. Величину перекрестной реакции определяли как отношение молярных концентраций тироксина и триодтиронина, приводящих к 50%-ному торможению связывания антител с иммобилизованным антигеном.

*Стандартные растворы тироксина в сыворотке.* Пул донорских сывороток или лошадиную сыворотку объемом 100 мл центрифугировали при 15 000 об/мин, инактивировали 30 мин при 56° С, затем пропускали через колонку (1×5 см) с активированным углем.

Тироксин растворяли в DMSO в концентрации 1 мг/мл и готовили его базовый раствор в сыворотке в концентрации 10 мкг/мл, из которого готовили стандартные растворы в сыворотке в концентрации 0; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 нг/мл.

*Конъюгирование антител с ферментом.* К раствору 1 мг пероксидазы в 0,1 мл воды добавляли 1 мг периодата натрия в 25 мкл воды. Смесь инкубировали 2 ч в темноте при 20° С, пропускали через 0,5-см слой сефадекса G25 и смешивали с 4 мг антител в 0,1 М карбонат-бикарбонатном буфере, pH 9,5. Через 3 ч добавляли 0,1 мг боргидрида натрия, инкубировали 1 ч и диализовали конъюгат против воды. Затем конъюгат осаждали 75% раствором сульфата аммония, центрифугировали и растворяли в воде. После диализа против ЗФР конъюгат хранили в ЗФР в концентрации 10 мг/мл с добавлением 0,01% мертиолята.

*Твердофазный иммунометрический анализ тироксина.* В лунки планшета с сорбированным конъюгированным антигеном вносили по 50 мкл стандартного раствора тироксина или пробы сыворотки крови больного. Затем в лунки добавляли по 50 мкл раствора 0,05% АНС в 0,05 М веронал-мединаловом буфере, pH 8,6, с 0,05% твин-20, инкубировали 3 мин и добавляли 50 мкл антител к тироксину с пероксидазой в разведении 1 : 1500 в том же буфере. Смесь инкубировали при непрерывном встряхивании в течение 45 мин при 20° С. Ферментативную реакцию проводили как описано выше.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chopra I. J., Solomon D. H., Ho R. S.//J. Clin. Endocrinol. 1971. V. 33. P. 865—868.
2. Ullman E. F., Yoshida R. A., Blakemore J. I., Maggio E., Leute R.//Biochim. et biophys. acta. 1979. V. 567. P. 66—74.
3. Ferrua B., Genetet F., Savaron M. L., Moulin C., Salard J. L., Masseyeff R.//J. Immunol. Meth. 1986. V. 87. P. 137—143.



4. *Mpoko C. N., Gordon D. B., Laing I., Corbitt G., Storey C. C.*//Clin. chem. acta. 1985. V. 146. P. 215—222.
5. *Siebert G. R., Armstrong J.*//US Patent. 1989. 4. 888. 296.
6. *Kohler G., Milstein C.*//Nature. 1975. V. 256. P. 495—497.
7. *Danilova N. P., Vasilov R. G.*//Immunol. Lett. 1991. V. 28. P. 79—84.
8. *Beatty J. D., Beatty B. G., Vlahos W. G.*//J. Immunol. Meth. 1987. V. 100. P. 173—179.

Поступила в редакцию  
30.XII.1992

*N. P. Danilova, N. V. Krupina, M. V. Mertz, R. G. Vasilov*

## PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST THYROXINE

*SPA «Biotechnologia», Moscow*

Spleen cells of BALB/c mouse immunized with the keyhole limpet haemocyanin and thyroxine conjugate were fused with P3-X63-Ag8.653 mouse myeloma cells to produce. Four monoclonal antibodies selected by indirect ELISA and partially characterized. One antibody, IB7, chosen for immunoassay, was produced in mouse ascites fluid, purified and analyzed; it proved to belong to the IgG1 subclass. The cross-reactivity with triiodothyronine was less than 1%, the association constant was  $3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ .