

О.О.Фоменков, Г.Д.Елагин, Г.В.Куклина, Д.В.Печенкин, В.В.Крупин, Н.В.Богачева, А.А.Кытманов, А.В.Еремкин, О.В.Тихвинская, Е.Ю.Вахнов

## ПОЛУЧЕНИЕ ГИБРИДОМ-ПРОДУЦЕНТОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУЛЯРЕМИИ

Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны, Киров, Российская Федерация

В ходе исследований было проведено два эксперимента по гибридизации клеток мышинной миеломы и лимфоцитов мышей линии BALB/c, иммунизированных инактивированными микробными культурами *Francisella tularensis*. В результате были получены гибридомы-продуценты моноклональных антител (МКА), специфичных к антигенам возбудителя туляремии. Оценена перспективность применения их для выявления данного возбудителя методом иммуноферментного анализа. Установлено, что моноклональные антитела, продуцируемые гибридомами 31G1F10, 32E5D3, 35B11C8, 36C2F11, позволяют выявлять микробные клетки различных штаммов возбудителя туляремии в концентрации  $0,5 \cdot 10^6$  м.к./см<sup>3</sup> и не взаимодействуют с культурами гетерологичных микроорганизмов в концентрациях  $1,0 \cdot 10^8$  м.к./см<sup>3</sup>, что свидетельствует об их специфичности. Планируется использовать полученные МКА в работе по созданию иммуноферментных и иммунохроматографических тест-систем, предназначенных для обнаружения возбудителя туляремии.

*Ключевые слова:* туляремия, моноклональные антитела, иммуноферментный анализ, иммунодиагностика.

O.O.Fomenkov, G.D.Elagin, G.V.Kuklina, D.V.Pechenkin, V.V.Krupin, N.V.Bogacheva, A.A.Kytmanov, A.V.Eremkin, O.V.Tikhvinskaya, E.Yu.Vakhnov

### Manufacturing of Hybridomas-Producers of Monoclonal Anti-Bodies to Tularemia Agent Antigens

Filial Branch of the 48<sup>th</sup> Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Kirov, Russian Federation

Carried out have been two experimental studies on hybridization of mouse myeloma cells and lymphocytes of BALB/c mice immunized with inactivated microbe *Francisella tularensis* cultures. As a result obtained have been hybridomas-producers of monoclonal antibodies (MAb) specific to the antigens of tularemia agent. Evaluated have been the prospects of its application for the detection of the agent under discussion using enzyme-linked immunoassay. Established is the fact that monoclonal antibodies produced by 31G1F10, 32E5D3, 35B11C8, 36C2F11 hybridomas make it possible to identify microbe cells of various tularemia agent strains when concentrated up to  $0.5 \cdot 10^6$  mc/sm<sup>3</sup>, and do not interact with cultures of heterologous microorganisms when concentrated to  $1.0 \cdot 10^8$  mc/sm<sup>3</sup>, which testifies to their specificity. These MAb are planned to be used for the construction of immune-enzyme and immune-chromatographic test-systems designed for tularemia agent detection.

*Key words:* tularemia, monoclonal antibodies, enzyme-linked immunoassay, immune-diagnostics.

Туляремия представляет собой зоонозное природно-очаговое инфекционное заболевание, характеризующееся различными механизмами и путями передачи возбудителя, лихорадкой, интоксикацией, образованием лимфаденитов, полиморфизмом клеточных проявлений и затяжным течением [2]. Несмотря на несомненные успехи в борьбе с возбудителями особо опасных болезней в целом, значимость туляремийного микроба как этиологического фактора в патологии человека не только не снижается, но и проявляет тенденцию к нарастанию [1]. Периодически регистрируются спорадические случаи и крупные вспышки туляремии [6, 8].

К настоящему времени для выявления *Francisella tularensis* и диагностики туляремии отечественными и зарубежными учеными предложено множество различных диагностических тестов. Однако официально зарегистрированы единичные тест-системы и препараты, большая часть из которых – экспериментальные разработки [3, 4].

Создание современных средств иммунодиагностики, предназначенных для обнаружения возбудителей особо опасных инфекционных заболеваний бактериальной природы, невозможно без высокоак-

тивных специфических антител.

Цель работы состояла в получении гибридных клеточных линий, секретирующих иммуноглобулины к специфическим эпитопам антигенов возбудителя туляремии. Для достижения поставленной цели представлялось необходимым решить следующие задачи: получить гибридомы-продуценты моноклональных антител к антигенам возбудителя туляремии; наработать препараты специфических туляремийных моноклональных антител и оценить перспективность их применения для выявления *F. tularensis*.

### Материалы и методы

Препарат для иммунизации лабораторных животных готовили из смеси суспензий инактивированных микробных культур *F. tularensis* штаммов Schu, 503 и 543 в равных концентрациях, с конечным содержанием общего количества микроорганизмов в смеси  $3,0 \cdot 10^{10}$  м.к./см<sup>3</sup>, с добавлением  $2,0$  мг/см<sup>3</sup> геля гидроокиси алюминия. Иммунизацию осуществляли подкожно 4-кратно с интервалом в 7 сут. Доза препарата составила  $1,0 \cdot 10^9$ ,  $2,0 \cdot 10^9$ ,  $4,0 \cdot 10^9$ -и  $8,0 \cdot 10^9$  м.к. соответственно. Через 18 дней после иммунизации

осуществляли взятие крови из параорбитального синуса и определяли титр специфических антител методом иммуноферментного анализа.

Через 20 дней после последней иммунизации животным делали бустерную инъекцию смесью инактивированных микробных клеток *F. tularensis* штаммов Schu, 503, 543. Культуру вводили внутрибрюшинно в дозе  $15 \cdot 10^9$  м.к. на мыш. На четвертые сутки селезенку асептически извлекали, спленоциты получали путем перфузии средой RPMI-1640 с буфером HEPES.

Слияние В-лимфоцитов селезенки мыши и клеток миеломы SP2/0-Ag14 проводили 50 % раствором полиэтиленгликоля с молекулярной массой 1450 по методике G.Kohler и C.Milstein [7] в модификации De St.Fazekas и P.Scheidegger [5].

Продуцирующую активность гибридных культур определяли, начиная с 10-х суток после гибридизации, дважды с интервалом 3 дня в иммуноферментном анализе. Культуральную жидкость в объеме 100 мкл вносили в планшеты, сенсibilизированные туляремийным антигеном, состоящим из смеси инактивированных бактерий *F. tularensis* штаммов Schu, 503 и 543 в равных концентрациях, с конечным содержанием общего количества микроорганизмов в смеси  $2,0 \cdot 10^7$  м.к./см<sup>3</sup> в 50 мМ карбонат-бикарбонатном буфере с pH 9,6. Клонирование культур гибридных клеток проводили методом лимитирующих разведений.

С целью изучения культуральных свойств гибридом готовили разведения культур от  $2,0 \cdot 10^5$  до  $6,25 \cdot 10^3$  кл./см<sup>3</sup> и засеивали ими лунки 24-луночного планшета в объеме 1,0 см<sup>3</sup>. Культивирование осуществляли в течение 5 сут. За минимальную посевную концентрацию принимали концентрацию клеток, при которой на 5-е сутки не наблюдали гибели культуры.

Изучение секреторных свойств полученных клонов проводили в процессе культивирования *in vitro* в 24-луночных планшетах в течение 10 пассажей, а также *in vivo* в процессе 4 пассажей при введении клеток гибридом в брюшную полость мышей линии BALB/c в дозе  $1,0 \cdot 10^6$  кл./см<sup>3</sup>.

Имуноглобулины из асцитных жидкостей выделяли методом двукратного переосаждения сульфатом аммония с последующим диализом против 0,15 М NaCl, забуференного 20 мМ фосфатного буферного раствора с pH 7,5.

Изучение диагностических возможностей полученных препаратов моноклональных антител проводили в твердофазном иммуноферментном анализе (ТИФА) с использованием культур *F. tularensis* штаммов 503, 543 и Schu в концентрации от  $4,0 \cdot 10^6$  до  $1,25 \cdot 10^5$  м.к./см<sup>3</sup> с двукратным шагом, а также гетерологичных микробных культур *Yersinia pseudotuberculosis* штамма 681, *Yersinia pestis* штамма EV, *Burkholderia pseudomallei* штамма C-141, *Burkholderia mallei* штамма Ц-5, *Brucella abortus* штамма 19-BA, *Escherichia coli* штамма 101, *Bacillus anthracis* штамма СТИ-1 в концентрации  $1,0 \cdot 10^8$  м.к./см<sup>3</sup>. Планшет

сенсibilизировали туляремийными кроличьими иммуноглобулинами в концентрации 20 мкг/см<sup>3</sup> в 50 мМ карбонат-бикарбонатном буфере. После отмытки в лунки планшета вносили гомо- и гетерологичные микробные культуры в указанных выше концентрациях, а затем – антимышинные иммуноглобулины, меченные пероксидазой хрена.

### Результаты и обсуждение

Эффективность проведенной иммунизации животных смесью суспензий инактивированных микробных культур *F. tularensis* штаммов Schu, 503 и 543 оценивалась по титру сывороточных антител.

Представленные в табл. 1 данные свидетельствуют о том, что исследуемые сыворотки взаимодействуют с культурами бактерий *F. tularensis* разных штаммов в титрах от 1:4000 до 1:128000, при этом титр антител в сыворотках, полученных от животных № 2 и 5, составил более чем 1:32000 со всеми исследуемыми штаммами. Данные животные были использованы в работе в качестве источника иммунных спленоцитов.

Проведено два эксперимента по гибридизации клеток мышинной миеломы и лимфоцитов иммунизированных мышей линии BALB/c. В результате тестирования гибридных культур были выявлены 103 первично-позитивные гибридные линии клеток, продуцирующие антитела к антигенам возбудителя туляремии. Для дальнейшей работы были отобраны и криоконсервированы 30 первичных культур. Для последующего клонирования использовали 10 гибридных культур с наиболее высоким уровнем продукции антител.

Изучение специфичности полученных клонов показало, что гибридные клетки линий 31E3B9, 35A4B5 продуцировали антитела, перекрестно-реагирующие с антигенами кишечной палочки, а также возбудителей псевдотуберкулеза, чумы и бруцеллеза. Остальные клонированные гибридомы продуцировали антитела, не реагирующие с гетерологичными микробными культурами. Результаты исследования представлены в табл. 2.

Полученные клоны гибридом при культивировании устойчиво сохраняли способность секретировать антитела к антигенам возбудителя туляремии на протяжении 10 пассажей *in vitro*. При этом их минимальная посевная концентрация находилась на уровне от  $12,5 \cdot 10^3$  до  $25,0 \cdot 10^3$  кл./см<sup>3</sup>.

На следующем этапе была оценена перспектив-

Таблица 1

Специфическая активность сывороток к антигенам *F. tularensis*

Сыворотка животного, №	Титр антител в сыворотке при исследовании в ИФА с культурой <i>F. tularensis</i>		
	Schu	503	543
1	1:8000	1:32000	1:16000
2	1:32000	1:64000	1:32000
3	1:4000	1:8000	1:4000
4	1:8000	1:16000	1:16000
5	1:32000	1:128000	1:64000

Культуральные и продуктивные свойства гибридом

Наименование гибридной клеточной линии	Минимальная посевная концентрация, 10 <sup>3</sup> кл./см <sup>3</sup>	Оптимальная посевная концентрация, 10 <sup>3</sup> кл./см <sup>3</sup>	Титр МКАТ в культуральной жидкости	Титр МКАТ в асцитной жидкости
31G1F10	25,0	100	1:2560	1:800000
32E5D3	12,5	50	1:2560	1:400000
35B11C8	25,0	100	1:1280	1:400000
35F3G10	25,0	100	1:10240	1:1600000
35H10G2	12,5	50	1:10240	1:1600000
36B8E11	25,0	100	1:10240	1:800000
36C2F11	25,0	100	1:2560	1:800000
36D5F4	25,0	100	1:1280	1:400000

Примечание: специфическая активность представлена в виде медиан титров антител (n=5).

ность применения полученных моноклональных антител для выявления микробных культур *F. tularensis* (табл. 3). Представленные результаты, свидетельствуют о том, что моноклональные антитела, продуцируемые гибридами 31G1F10, 32E5D3, 35B11C8, 36C2F11, позволяют при помощи ТИФА выявлять микробные клетки *F. tularensis* штаммов 503, 543 и Schu в концентрации 0,5·10<sup>6</sup> м.к./см<sup>3</sup>. Антитела, продуцируемые гибридами 35F3G10, 35H10G2, 36B8E11, 36D5F4, обладают специфической активностью к различным штаммам туляремийного микроба на уровне 1,0–4,0·10<sup>6</sup> м.к./см<sup>3</sup>. Все исследованные антитела в иммуноферментном анализе не взаимодействуют с культурами гетерологичных микроорганизмов *Y. pseudotuberculosis* штамма 681, *Y. pestis* штамма EV, *B. pseudomallei* штамма C-141, *B. mallei* штамма Ц-5, *B. abortus* штамма 19-BA, *E. coli* штамм 101, *B. anthracis* штамма СТИ-1 в концентрациях 1,0·10<sup>8</sup> м.к./см<sup>3</sup>, что свидетельствует об их специфичности.

Таким образом, наиболее перспективными для выявления микробных культур *F. tularensis* являются моноклональные антитела, продуцируемые гибридными клетками линий 31G1F10, 32E5D3, 35B11C8, 36C2F1. Гибридомы-продуценты и препараты моноклональных антител паспортизованы. Их планируется использовать в работе по конструированию иммуноферментных и иммунохроматографических тест-систем, предназначенных для обнаружения возбудителя туляремии.

Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Таблица 3

Оценка диагностических возможностей полученных препаратов моноклональных антител

МКАТ	Выявляемая концентрация микробных культур, 10 <sup>6</sup> м.к./см <sup>3</sup>		
	<i>F. tularensis</i> штамм 503	<i>F. tularensis</i> штамм 543	<i>F. tularensis</i> штамм Schu
31G1F10	0,5	0,5	0,5
32E5D3	0,5	0,5	0,5
35B11C8	0,5	0,5	0,5
35F3G10	2,0	4,0	2,0
35H10G2	2,0	4,0	2,0
36B8E11	2,0	4,0	2,0
36C2F11	0,5	0,5	0,5
36D5F4	1,0	0,5	1,0

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безсмертный В.Е., Горшенко В.В., Попов В.П. К оценке эпидемической и эпизоотической ситуации по туляремии в Российской Федерации. *Пробл. особо опасных инф.* 2008; 2(96):8–12.
2. Никифоров В.В., Кареткина Г.Н. Туляремия: от открытия до наших дней. *Инф. болезни.* 2007; 5(1):67–76.
3. Сырова Н.А., Терешкина Н.Е., Девдариани З.Л. Современное состояние иммунодиагностики туляремии. *Пробл. особо опасных инф.* 2008; 3(97):12–5.
4. Терешкина Н.Е., Терехова И.В., Сырова Н.А., Девдариани З.Л., Ляшова О.Ю., Григорьева Г.В., Любовикова О.А., Шульгина И.В., Иваненко И.Л., Захарова Н.Б., Безрукова Г.А., Спирин В.Ф. Конструирование и медицинские испытания моноклональной dot-иммуноферментной тест-системы для детекции туляремийного микроба «ДИАТуЛ-М». *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 2:42–5.
5. Fazekas De St., Groth S., Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Meth.* 1980; 35:1–21.
6. Hauri A.M., Hofstetter I., Seibold E., Kaysser P., Eckert J., Neubauer H., Spletstoesser W.D., Investigating an airborne tularemia outbreak, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16:238–43.
7. Kohler G., Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975; 256(5517):495–7.
8. Willke A., Meric M., Granow R., Sayan M. An outbreak of oropharyngeal tularemia linked to natural spring water. *J. Med. Microbiol.* 2009; 1:112–16.

References

1. Bezsmertny V.E., Gorshenko V.V., Popov V.P. [On the assessment of tularemia epidemic and epizootic situation in the Russian Federation]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2008; 2(96):8–12.
2. Nikiforov V.V., Karetkina G.N. [Tularemia: since the discovery to the present day]. *Infek. Bol.* 2007; 5(1):67–76.
3. Syrova N.A., Tereshkina N.E., Devdariani Z.L. [Current state of tularemia immuno-diagnostics]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2008; 3(97):12–5.
4. Tereshkina N.E., Terekhova I.V., Syrova N.A., Devdariani Z.L., Lyashova O.Yu., Grigor'eva G.V., Lobovikova O.A., Shul'gina I.V., Ivanenko I.L., Zakharova N.B., Bezrukova G.A., Spirin V.F. [Constructing and medical trials of a monoclonal dot-immuno-enzyme test-system "DIATul-M" for tularemia microbe detection]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 2:42–5.
5. Fazekas De St., Groth S., Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Meth.* 1980; 35:1–21.
6. Hauri A.M., Hofstetter I., Seibold E., Kaysser P., Eckert J., Neubauer H., Spletstoesser W.D., Investigating an airborne tularemia outbreak, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16:238–43.
7. Kohler G., Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975; 256(5517):495–7.
8. Willke A., Meric M., Granow R., Sayan M. An outbreak of oropharyngeal tularemia linked to natural spring water. *J. Med. Microbiol.* 2009; 1:112–16.

Authors:

Fomenkov O.O., Elagin G.D., Kuklina G.V., Pechenkin D.V., Krupin V.V., Bogacheva N.V., Kytmanov A.A., Eremkin A.V., Tikhvinskaya O.V., Vakhnov E.Yu. Filial Branch of the 48<sup>th</sup> Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Kirov, Russian Federation

Об авторах:

Фоменков О.О., Елагин Г.Д., Куклина Г.В., Печенкин Д.В., Крупин В.В., Богачева Н.В., Кытманов А.А., Еремкин А.В., Тихвинская О.В., Вахнов Е.Ю. Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны. Российская Федерация, Киров.

Поступила 22.08.14.