



УДК 577.112.083.3

## ИММУНОФЕРМЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

© 1999 г. О. Е. Лахтина, Л. Е. Петровская, В. Г. Коробко, В. А. Несмеянов<sup>#</sup>*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 14.01.99 г. Принята к печати 21.04.99 г.

Получен набор из семи гибридом, секретирующих моноклональные антитела к рекомбинантному гранулоцитарно-макрофагальному колониестимулирующему фактору человека (рГМ-КСФ). Охарактеризованы свойства моноклональных антител и выявлены пары антител, направленных к разным эпитопам молекулы рГМ-КСФ. На основе двух антител разработан чувствительный и простой метод твердофазного иммуноферментного анализа рГМ-КСФ, в котором одно из антител сорбируется на иммунологический планшет, а другое, меченное биотином, используется для детекции ГМ-КСФ, связанного с первым антителом. Биотинилированное антитело в свою очередь выявляется конъюгатом стрептавидин–пероксидаза хрена. Чувствительность теста не ниже 0.5 нг/мл, интервал линейности – 0.5–32 нг/мл. Тест-система не дает перекрестных реакций с человеческим фактором некроза опухолей-альфа, гранулоцитарным колониестимулирующим фактором, интерлейкином-2 и интерлейкином-3.

*Ключевые слова:* гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; моноклональное антитело; иммуноферментный анализ.

### ВВЕДЕНИЕ

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) – один из представителей цитокинов, обуславливающих рост и дифференцировку костномозговых клеток, прежде всего гранулоцитов и макрофагов [1]. У человека ГМ-КСФ действует на ранние полипотентные стволовые клетки, обеспечивая созревание не только гранулоцитов и макрофагов, но и других популяций клеток белой крови. Помимо клеток костного мозга мишенями ГМ-КСФ являются зрелые лейкоциты. В его присутствии наблюдается усиление противомикробной и противоопухолевой активностей гранулоцитов и макрофагов, индуцируется биосинтез макрофагальных цитокинов IL-1, M-CSF, TNF-α [2]. Эти свойства делают ГМ-КСФ перспективным лекарственным средством, в частности, для терапии угнетенного кроветворения у раковых больных после облучения и химиотерапии [3].

В организме человека ГМ-КСФ синтезируется клетками различных типов, включая Т-лимфоциты, макрофаги, тучные и эндотелиальные клетки, фибробласты [1–3]. Синтез этого цитокина может сопровождать и некоторые патологические процессы, а именно: опухолевый рост, иммунодефициты, аллергические реакции [1, 3]. Уровень ГМ-КСФ в крови повышается при инфекциях, достигая уровня нескольких нанограммов в миллилитре, хотя в норме он не превышает 200 пг/мл [4]. Количество ГМ-КСФ, накапливающиеся при культивировании *in vitro* нормальных и трансформированных клеток, также очень малы и составляют пикограммы/нанограммы в миллилитре. Поэтому, как и в случае других цитокинов, получение ГМ-КСФ для использования в клинике может осуществляться только на основе генно-инженерных подходов путем создания бактериальных или дрожжевых штаммов-суперпродукторов этого белка. Рекомбинантный бактериальный ГМ-КСФ (рГМ-КСФ) обладает той же биологической активностью, что и природный, хотя и не гликозилирован. Клинические испытания рГМ-КСФ, проводящиеся в различных странах, показали его эффективность при лечении индуцированной химиотерапией миелосупрессии, иммунодефицитов и стимуляции гемопоэза после трансплантации костного мозга [5–10].

Сокращения: ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; БСА – бычий сывороточный альбумин; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; ФСБ-Т – фосфатно-солевой буфер, содержащий 0.05% Твин-20; МА – моноклональное антитело; ИФА – иммуноферментный анализ.

<sup>#</sup> Автор для переписки (e-mail: vnes@ibch.siobc.ras.ru).

## Характеристики МА к рГМ-КСФ человека

Моноклональ- ное антитело	Подкласс	$K_a \times 10^{-8}, M^{-1}$	Связывание с рГМ-КСФ в иммуноб- лоттинге
B10D5	G1	н.о.	–
C4D9	G3	0.2	+
C3E9	G1	1.7	+
C5B4	G1	0.2	+
E3F5	G2b	н.о.	+
F10F4	G1	1.1	+
G11C2	G2b	0.1	+

н.о. – не определялась.

В ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН созданы штаммы *E. coli*, продуцирующие рГМ-КСФ [11]. В качестве лидерного пептида в них использована сигнальная последовательность белка Caf1 *Yersinia pestis*, обеспечивающая секрецию рГМ-КСФ в периплазматическое пространство *E. coli*. Наличие рГМ-КСФ позволяет разработать технологию его получения для создания отечественного лекарственного препарата, однако составной частью, необходимой как для производства, так и для последующего клинического использования, является наличие простого, надежного, чувствительного метода тестирования. Классический биотест, в котором для детекции ГМ-КСФ используются клетки костного мозга, для данной цели малопригоден ввиду сложности и неоперативности [12]. В последние годы для биологического тестирования ГМ-КСФ используют пролиферативный тест на линиях лейкозных клеток, однако эти линии не обладают абсолютной специфичностью и отвечают помимо ГМ-КСФ на другие цитокины [13].

Поэтому наиболее часто для определения ГМ-КСФ, как и других цитокинов в настоящее время используются иммунохимические методы, основанные на применении моноклональных антител – иммуноферментный анализ или латекс-агглютинация. Тест-системы для анализа ГМ-КСФ на основе моноклональных и поликлональных антител описаны рядом зарубежных авторов [10, 13–15], а также выпускаются некоторыми фирмами, например, Genzyme (США), Instar Corporation (США). В России моноклональные антитела к ГМ-КСФ отсутствовали, поэтому нами была предпринята попытка получения подобных антител и создания на их основе двухсайтовой иммуноферментной тест-системы.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения МА в качестве иммуногена использовали рГМ-КСФ ввиду труднодоступности природного фактора. Продуцентом рГМ-КСФ являлся штамм JM101 *E. coli*, трансформированный плазмидой рFGM13, кодирующей ГМ-КСФ, в котором второй и третий аминокислотные остатки (Pro-Ala) зрелой части белка заменены остатком аспарагиновой кислоты [11]. Данная замена не влияла на биологическую активность ГМ-КСФ. Ввиду того, что полученный штамм секретировал рекомбинантный белок в периплазматическое пространство *E. coli*, конечный продукт был растворимым и обладал физико-химическими и биологическими характеристиками природного цитокина. Его удельная активность, определенная в биотесте, составляла  $10^8$  ед./мг белка.

рГМ-КСФ выделяли из препарата периплазматической фракции клеток *E. coli* как описано ранее [11] хроматографиями на DEAE-сефацелле, октил-сефарозе CL 4В и на заключительной стадии с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Чистота полученного рГМ-КСФ по данным аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ составляла около 98%.

Гибридомы получали по классической методике [16], используя в качестве клеток-партнеров миеломную линию P3X63-Ag8.653. По истечении двух недель в контрольных лунках, содержащих миелому, не осталось живых клеток, в то время как в большинстве ячеек наблюдался рост клеточных клонов. Тестирование проводили на 10–14-е сут при помощи твердофазного ИФА, позволившего обнаружить несколько десятков положительных клонов. Из них было отобрано 15 первичных клонов, уровень активности которых в 10–12 раз превышал контроль. Их клонирование проводили дважды и в дальнейшем от каждого первичного клона было взято по одному наиболее активному моноклону.

Гибридомы наращивали в асцитах мышей. Выращенные асциты были получены от семи гибридом, с которыми и проводилась дальнейшая работа. Класс и субкласс МА определяли двойной иммунодиффузией по методу Ухтерлони [17] и при помощи твердофазного ИФА, используя коммерческие моноспецифические антисыворотки. Все полученные МА относились к иммуноглобулинам класса G (таблица).

Для выделения МА из асцитной жидкости использовали аффинную хроматографию на белок А-сефарозе CL-4В. Из 1 мл асцита удавалось выделить 4–5 мг иммуноглобулина. Полученные препараты МА были гомогенны по данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и обладали рГМ-КСФ-связывающей активностью в твердофазном ИФА.



Характеристики семи полученных МА приведены в таблице. Константы аффинности варьировали в интервале  $(0.1-1.7) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ . Полученные МА, за исключением B10D5, связывались в вестерн-блоттинге с очищенным рГМ-КСФ, что скорее всего говорило о том, что они взаимодействовали с линейными детерминантами.

Важнейшей характеристикой МА является их специфичность – отсутствие перекрестных реакций с другими антигенами. Уже на начальной стадии отбора положительных клонов были исключены МА, дающие перекрестную реакцию с БСА. С помощью вестерн-блоттинга было продемонстрировано, что полученные антитела связываются лишь с одним белком периплазмы клеток *E. coli*, трансформированных плазмидой рFGM13, и этот белок соответствует по подвижности рГМ-КСФ (рис. 1). Наиболее интенсивное окрашивание при связывании давали антитела G11C2. Связывания с периплазматическими белками дикого штамма не наблюдалось.

При разработке тест-системы на человеческий ГМ-КСФ мы остановились на двухсайтовом ИФА, в котором одно МА сорбируется на твердую подложку (планшет), а второе, взаимодействующее с эпитопом белка, неперекрывающимся с эпитопом первого антитела, служит для обнаружения захваченного первым МА цитокина. При этом второе антитело было биотинилировано с целью применить для детекции конъюгат стрептавидин–пероксидаза.

Первой задачей при создании двухсайтовой тест-системы был подбор пары МА, направленных к разным эпитопам молекулы ГМ-КСФ и способных одновременно взаимодействовать с этим белком. С этой целью были получены биотинилированные МА C4D9 и G11C2. Биотинилирование антител проходило в мягких условиях с сохранением антигенсвязывающей способности, что было продемонстрировано с помощью твердофазного ИФА. Были проверены различные комбинации двух биотинилированных антител с остальными МА. Кривые титрования некоторых пар антител приведены на рис. 2 и 3. Основными параметрами при отборе служили предельно достигаемая чувствительность теста и максимально протяженный интервал линейного участка дозой зависимости. Для разных пар МА эти параметры существенно различались. Лучшие результаты получались, когда в качестве детектирующего антитела использовалось МА C4D9. В итоге из девяти проверенных пар антител было выбрано оптимальное сочетание: МА G11C2 в качестве подложки и биотинилированное МА C4D9 для детекции рГМ-КСФ. Оптимизация системы включала подбор концентраций сорбируемого и детектирующего (биотинилированного) МА. На рис. 3 приведена калибровочная кривая сэндвич-имму-

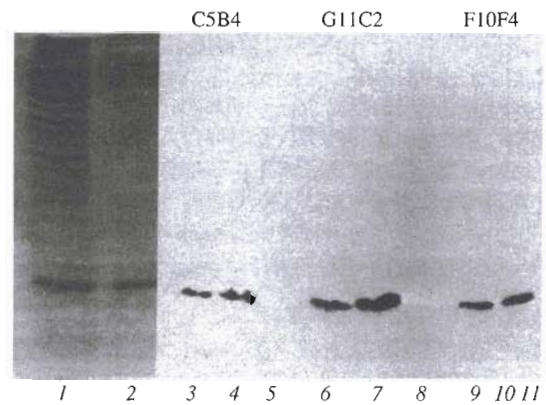


Рис. 1. Взаимодействие в вестерн-блоттинге МА C5B4, F10F4 и G11C2 с очищенным рГМ-КСФ и с белками периплазматической фракции клеток *E. coli* JM101, исходных и трансформированных плазмидой рFGM13. Дорожки 1, 2 – окрашивание кумасси R-250, 3–11 – проявление МА к рГМ-КСФ. Дорожки 1, 4, 7, 10 – белки периплазматической фракции клеток *E. coli* JM101, трансформированных плазмидой рFGM13. 2, 3, 6, 9 – частично очищенный рГМ-КСФ, 5, 8, 11 – белки периплазматической фракции исходных клеток *E. coli* JM101.

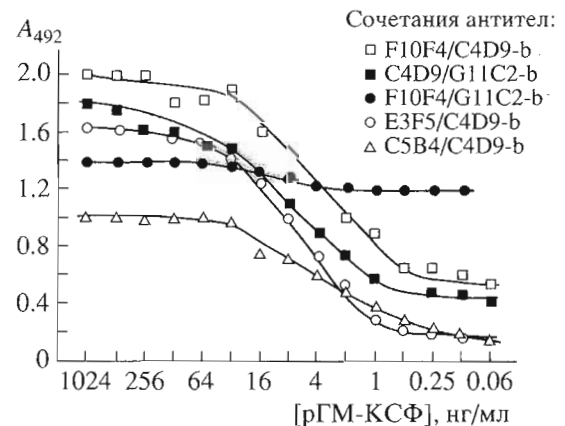
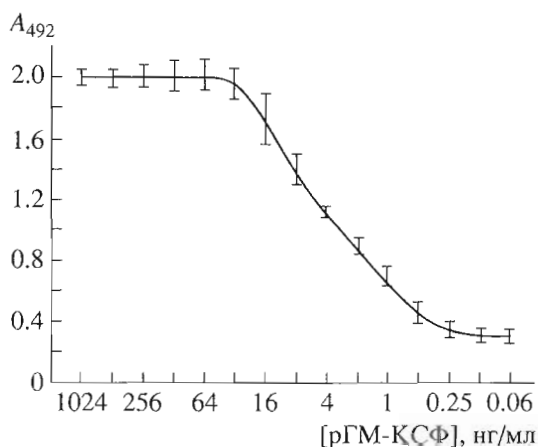


Рис. 2. Двухсайтовый сэндвич-ИФА рГМ-КСФ с использованием различных сочетаний антител. Сорбируемые МА F10F4, C4D9, E3F5, C5B4. Детектирующие биотинилированные МА – C4D9-b и G11C2-b.

ноферментного определения рГМ-КСФ с помощью этих МА. Чувствительность определения (наименьшая концентрация рГМ-КСФ, при которой разница оптического поглощения между опытом и контролем была не ниже 0.1) составила 0.25–0.5 нг/мл – немногим ниже чувствительности биотеста [13], интервал линейности 0.5–32 нг/мл. Эти параметры определения мало изменялись от опыта к опыту. Время определения рГМ-КСФ после иммобилизации сорбирующих антител на пластик составляло 3 ч. Разработанная тест-система оказалась пригодной и для анализа рекомби-



**Рис. 3.** Оптимизированный двухсайтовый сэндвич-ИФА рГМ-КСФ с использованием МА G11C2 в качестве подложки и биотинилированного МА С4D9.

нантного дрожжевого ГМ-КСФ, производимого фирмой Immupex (Сиэтл, США).

Специфичность предложенной тест-системы была проверена в экспериментах с некоторыми другими рекомбинантными цитокинами, а именно, человеческими фактором некроза опухолей-альфа, гранулоцитарным колониестимулирующим фактором, интерлейкином-2 и интерлейкином-3. Связывание этих цитокинов было на уровне фона по крайней мере до их концентрации 1 мкг/мл.

Чувствительность в диапазоне 0.2–0.5 нг/мл характерна для двухсайтовых систем ИФА, в которых используется пара МА [18]. В то же время она была несколько ниже, чем у тест-систем на ГМ-КСФ, описанных авторами работ [13–15]. Так, Ларикио-Робио [15] и Окамура с соавт. [14], используя на стадии детекции поликлональные аффинно-очищенные антитела против рГМ-КСФ, добились чувствительности определения ГМ-КСФ 0.05–0.1 нг/мл. Применение в тест-системах поликлональных антител нередко повышает чувствительность анализа, однако имеет существенные недостатки, поскольку свойства антисыворотки (титр антител, аффинность, специфичность) варьируют от получения к получению. Поэтому Зенке с соавт. [13] предложили брать на стадии детекции коктейль из двух МА с неперекрывающимися эпитопами. В результате одна молекула ГМ-КСФ, связавшаяся с сорбированным на планшете МА, могла связывать две молекулы меченых детектирующих антител и чувствительность ИФА достигла 0.1 нг/мл против 5 нг/мл при использовании теми же авторами лишь одного МА. В то же время интервал линейности был уже, чем в нашей тест-системе: он заканчивался при 10 нг/мл ГМ-КСФ. Принцип ИФА с несколькими МА успешно использован также в высокочувствительной тест-системе для определения ГМ-КСФ фир-

мы Genzyme (Бостон, США). Приведенные данные говорят о том, что и в нашем случае при необходимости можно увеличить чувствительность анализа за счет применения смеси биотинилированных МА, однако предложенный уже сейчас вариант иммуоферментной тест-системы для обнаружения рекомбинантного человеческого ГМ-КСФ обладает достаточно высокой чувствительностью и может быть использован в работах, связанных с определением рГМ-КСФ при его производстве и с диагностикой некоторых патологических процессов в организме человека.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы следующие реактивы и расходные материалы: RPMI-1640, добавки к среде НАТ и НТ, эмбриональная телячья сыворотка адъювант Фрейнда и агар (Gibco, Шотландия), кроличьи антимышьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (ДАКО, Дания), орто-фенилендиамин, пристан, Твин-20, 2-меркаптоэтанол (Sigma, США), *N*-оксисукцинимидный эфир аминоксаноилбиотина (ICN, США), полиэтиленгликоль-6000 и бычий сывороточный альбумин (Serva, Германия), диметилсульфоксид (Merck, Германия), белок-А-сефароза CL-4B (Pharmacia, Швеция), пластиковая посуда для культивирования клеток и для ИФА (Nunc, Дания), дрожжевой ГМ-КСФ (Immupex, США). Конъюгат стрептавидин–пероксидаза был любезно предоставлен И.С. Павловой и А.А. Зинченко (ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН).

**Иммунизация.** Мышей BALB/c иммунизировали, вводя с двухнедельным интервалом 4 раза по 10 мкг рГМ-КСФ в подушечки задних лап: первый раз в полном, а далее в неполном адъюванте Фрейнда. Через 11 сут после последней иммунизации мышь бустировали инъекцией 10 мкг рГМ-КСФ в хвостовую вену и через 3 сут проводили гибридизацию. По данным ИФА титр специфических к рГМ-КСФ антител в сыворотке мыши перед слиянием клеток составил 1 : 25000.

**Гибридизация.** Нарращивание миеломных клеток Р3Х63-Ag8.653 для гибридизации, гибридизацию и дальнейшее введение клеточных культур проводили в RPMI-1640, содержащей 20% эмбриональной телячьей сыворотки и 50 мкМ 2-меркаптоэтанол. Слияние спленоцитов иммунной мыши с клетками миеломы проводили по методике [14], смешивая клетки в соотношении 5 : 1 и добавляя полиэтиленгликоль-6000. Клетки рассевали в ячейки 96-луночного иммунологического планшета и выдерживали сначала на среде с добавкой НАТ ( $10^{-4}$  М гипоксантин,  $4 \times 10^{-7}$  М аминокптерин и  $1.6 \times 10^{-5}$  М тимидин), а затем НТ ( $10^{-4}$  М гипоксантин и  $1.6 \times 10^{-5}$  М тимидин). Первичные гибридомные культуры дважды клонировали мето-



дом лимитирующих разведений с предельной плотностью 0.1–1 клетка на лунку.

**Иммуноферментный анализ.** Для проведения сэндвич-ИФА в ячейки 96-луночного планшета вносили по 100 мкл растворенного в ФСБ рГМ-КСФ (1 мкг/мл). Планшет выдерживали 1 сут при 4°C, промывали ФСБ-Т и инкубировали со 100 мкл на лунку 1% раствора БСА 1 ч при 37°C. После промывки ФСБ-Т, а затем ФСБ в лунки вносили по 100 мкл клеточного супернатанта или асцитную жидкость в двухкратных разведениях в ФСБ и инкубировали 1.5 ч при 37°C. В контрольные лунки на этой стадии вносили ФСБ. Планшет пятикратно промывали ФСБ-Т, инкубировали 40 мин при 37°C со 100 мкл на лунку конъюгата кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши (разведение 1 : 1000), меченных пероксидазой хрена, а затем после отмывки ФСБ-Т, с раствором *o*-фенилендиамина (1 мг/мл) в 0.1 М цитратном буфере, pH 4.45, содержащем 0.06% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Реакцию останавливали через 15 мин добавлением 100 мкл на лунку 10% раствора серной кислоты. Оптическое поглощение измеряли на спектрофотометре Titertec Multiskan при длине волны 492 нм.

**Наработка МА.** Гибридные клетки в количестве  $5 \times 10^6$ – $1 \times 10^7$  клеток вводили мышам линии BALB/c, которым за 10–14 сут до этого было внутрибрюшинно введено по 0.5 мл пристана. Через 12–14 сут мышей с опухолями забивали и собирали асцитную жидкость.

Аффинную хроматографию на белок-A-сефарозе CL-4В проводили согласно инструкции фирмы-изготовителя (Pharmacia, Швеция).

**Характеристика МА.** Класс и подкласс моноклональных антител определяли двойной иммунодиффузией по методу Ухтерлони [17] или при помощи твердофазного ИФА, используя коммерческие моноспецифические антисыворотки (DRG, США).

Константу связывания МА определяли с помощью ИФА, как предложено в работе [19], проводя расчет по уравнению

$$K_a = \frac{1}{4MA - 2MA''}$$

где МА'' – концентрация антител, соответствующая 50%-ному связыванию от максимального в случае нанесения в лунку планшета 0.2 мкг рГМ-КСФ, а МА – концентрация антител, соответствующая 50%-ному связыванию от максимального в случае нанесения 0.1 мкг рГМ-КСФ.

**Электрофорез и вестерн-блоттинг.** Электрофорез в 15% полиакриламидном геле проводили в восстанавливающих условиях по Лэммли [20]. Гель разрезали, одну часть окрашивали кумасси R-250, а с другой – белки переносили на нитро-

целлюлозную мембрану с помощью аппарата фирмы Ancos (Дания) согласно инструкциям фирмы-изготовителя. Детекцию белков, связывающихся полученные анти-рГМ-КСФ МА, проводили с помощью набора ECL Western blotting products (Amersham, Англия) в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя. Для этого мембрану инкубировали с блокирующим реагентом (БСА) в ФСБ-Т для нейтрализации участков сорбции белка, отмывали ФСБ-Т, разрезали и отдельные полоски обрабатывали в течение 1 ч при комнатной температуре растворами МА в ФСБ (20 мкг/мл). После промывки ФСБ-Т и ФСБ полоски инкубировали 1 ч при комнатной температуре с конъюгатом кроличьих антител к иммуноглобулинам мыши с пероксидазой хрена (разведение 1 : 1000). Полоски снова промывали ФСБ-Т и ФСБ и проявляли детектирующим раствором ECL Western blotting products (Amersham), позволяющим визуализировать связанную с мембраной пероксидазу по хемилюминесценции. На этой стадии полоски объединяли и закрепляли в кассете с рентгеновской пленкой. Пленку проявляли.

**Двухсайтовый ИФА.** МА (0.1 мкг/лунку, в ФСБ, pH 7.4) иммобилизовали в лунках 96-луночного планшета 1 сут при 4°C. Промывки и блокирование оставшихся на планшете мест связывания проводили как описано выше в разделе, посвященном ИФА. В лунки микропланшета добавляли разведения рГМ-КСФ или другого цитокина в ФСБ, содержащем 0.5% БСА, выдерживали 1 ч при 37°C, а затем вносили МА, меченное биотином (0.1 мкг/лунку). После отмывки ФСБ-Т инкубировали (1 ч, 37°C) со стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена (разведение 1 : 8000). Реакцию с субстратом проводили как описано выше.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят И.С. Павлову и А.А. Зинченко за предоставление конъюгата стрептавидин-пероксидаза. Работа финансировалась грантом РФФИ № 97-04-49550.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Metcalf D. // Science. 1985. V. 229. P. 16–22.
2. Clark S.C. // Int. J. Cell Cloning. 1988. V. 6. P. 365–377.
3. Groopman J.E., Molina J.-M., Scadden D.T. // New Eng. J. Med. 1989. V. 321. P. 1449–1459.
4. Omori F., Okamura S., Shimoda K., Otsuka T., Harada M., Niho Y. // Biotherapy. 1992. V. 4. P. 147–153.
5. Samanci A., Yi Q., Fagerberg J., Strigard K., Smith G., Ruden U., Wahren B., Mellstedt H. // Cancer Immunol. Immunother. 1998. V. 47. P. 131–142.
6. Aslan M., Yucel G., Bozcuk H., Savas B. // Cancer Immunol. Immunother. 1998. V. 47. P. 176–181.

7. Straus D.J., Huang J., Testa M.A., Levine A.M., Kaplan L.D. // *J. Clin. Oncol.* 1998. V. 16. P. 3601–3606.
8. Groopman J.E., Mitsuyasu R.T., DeLeo M.J., Oette D.H., Golde D.W. // *New Eng. J. Med.* 1987. V. 317. P. 593–598.
9. Brandt S.J., Peters W.P., Atwater S.K., Kurtzberg J., Borowitz M.J., Jones R.B., Shpall E.J., Bast R.C., Gilbert C.J., Oette D.H. // *New Eng. J. Med.* 1988. V. 318. P. 869–876.
10. Petros W., Rabinowitz J., Stuart A., Gilbert C., Kanakura Y., Griffin J., Peters W. // *Blood.* 1992. V. 80. P. 1135–1140.
11. Петровская Л.Е., Крюкова Е.А., Якимов С.А., Вульфсон А.Н., Алибаева Р.А., Шингарова Л.Н., Гузаев А.А., Абрамов В.М., Коробко В.Г. // *Биоорг. химия.* 1995. Т. 21. С. 912–919.
12. Sabbath K.D., Ball E.D., Larcom P., Davis R.B., Griffin G.D. // *J. Clin. Invest.* 1985. V. 75. P. 746–754.
13. Zenke G., Strittmater U., Tees R., Andersen E., Fagg B., Kocher H., Schreier M. // *J. Immunoassay.* 1991. V. 12. P. 185–206.
14. Omori F., Okamura S., Hayashi S., Yamaga S., Hirota Y., Niho Y. // *Biotherapy.* 1989. V. 1. P. 161–167.
15. Laricchia-Robbio L., Liedberg B., Platou-Viking T., Robero P., Beffy P., Revoltella R.P. // *Hybridoma.* 1996. V. 15. P. 343–350.
16. Kohler G., Milstein C. // *Nature.* 1975. V. 256. P. 485–497.
17. Hudson L., Hay F.C. *Practical Immunology.* 2nd Ed. Oxford; London; Edinburg; Boston; Melbourne: Blackwell Scientific Publications, 1980. P. 117–121.
18. Kennet D. // *J. Immunol. Methods.* 1988. V. 106. P. 203–209.
19. Beatty J.D., Beatty B.G., Vlahos W.G. // *J. Immunol. Methods.* 1987. V. 100. P. 173–179.
20. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.

## Enzyme Immunoassay for Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Using Monoclonal Antibodies

O. E. Lakhtina, L. E. Petrovskaya, V. G. Korobko, and V. A. Nesmeyanov<sup>#</sup>

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

A set of seven hybridomas producing monoclonal antibodies (MAbs) to the human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) was obtained. The properties of the monoclonal antibodies were characterized, and pairs of MAbs specific to different non-overlapping epitopes of GM-CSF were identified. A sensitive and simple method of two-site ELISA for GM-CSF was developed on the basis of two MAbs. According to this method, one MAb is absorbed onto a microtiter plate and another is labeled with biotin and used for the detection of GM-CSF bound to the first MAb. MAb labeled with biotin, in its turn, was visualized with the streptavidin-horseradish peroxidase conjugate. The sensitivity of this test was no less than 0.5 ng/ml, and a linear dose-response relationship was observed within a concentration interval from 0.5 to 32 ng/ml. No cross-reactivity was found with human tumor necrosis factor- $\alpha$ , granulocyte colony-stimulating factor, interleukin-2, or interleukin-3 in this test system.

*Key words:* granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; monoclonal antibody; enzyme immunoassay

---

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; e-mail: vnes@ibch.siobc.ras.ru.