



Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen Diclofenac

Stephan Schmidt^{1,2} (stephan.schmidt@bam.de), Sven Hanelt^{2,3} (SvenHanelt@web.de), Carsten Canitz^{2,4} (c.canitz@web.de), Holger Hoffmann^{1,5} (holger.hoffmann@bam.de), Leif-Alexander Garbe^{2,4} (garbe@mailbox.tu-berlin.de), Rudolf J. Schneider¹ (rudolf.schneider@bam.de)

¹ Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung (BAM), Abteilung 1: Analytische Chemie; Referenzmaterialien; Fachbereich Umweltanalytik, Richard-Willstätterstraße 11, 12489 Berlin-Adlershof/Germany

² Technische Universität Berlin, Institut für Biotechnologie, 10623 Berlin/Germany

³ Versuchsanstalt für Brauerei in Berlin (VLB) e.V., Forschungsinstitut für Spezialanalytik 13353 Berlin/Germany

⁴ Hochschule Neubrandenburg, Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmitteltechnologie, 17033 Neubrandenburg/Germany

⁵ Humboldt-Universität zu Berlin, 12489 Berlin-Adlershof/Germany

Abstract

Diclofenac (DCF) wird als nicht-steroidales, antientzündliches Arzneimittel gegen Fieber, Entzündungen, rheumatische Erkrankungen und Schmerzen eingesetzt. 70 % werden nach Einnahme wieder ausgeschieden. Aufgrund unvollständiger Elimination in den Kläranlagen lassen sich Rückstände im Trinkwasser und im Oberflächengewässer nachweisen. Diclofenac wird in der Umweltanalytik v.a. mittels GC-MS oder LC-MS nachgewiesen^[1, 2]. Bioanalytische Methoden machen sich die spezifische Antigen-Antikörper-Wechselwirkung zunutze, so z.B. Immunoassays. Die hierfür erforderlichen Antikörper werden durch Immunisierung mit einem Konjugat aus dem Analyten und einem Trägerprotein gewonnen. Die Kopplung kann direkt über die Carboxylfunktion von Diclofenac erfolgen. Um Abschirmungseffekte zu vermeiden, kann zwischen Protein und Analyt ein Spacer sinnvoll sein.

Einleitung

In den letzten Jahren haben immunanalytische Verfahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Grundlage bilden Antikörper mit ihrer hochspezifischen, nicht-kovalenten Antigen-Erkennung. Antikörper werden in Folge der humoralen Immunantwort gegen Makromoleküle oder Partikel ab einer molaren Masse von ca. 1.000 Da gebildet. Moleküle mit niedrigerem Gewicht sind nicht in der Lage allein eine Immunantwort auszulösen und werden als Haptene bezeichnet. Um Antikörper gegen Haptene zu erhalten ist die Kopplung an ein Trägerprotein erforderlich. Man unterscheidet zwischen polyklonalen und monoklonalen Antikörpern. Bei polyklonalen Antikörpern handelt es sich um Serum aus einem immunisierten Wirbeltier, meist einem Kaninchen. Dieses enthält eine Vielzahl von verschiedenen Antikörpern und weitere Substanzen, z.B. Lipide. Aus diesem Grund ist häufig eine Reinigung des Serums durch Immunaффinitätschromatographie empfehlenswert. Weiterhin gibt es monoklonale Antikörper, die aus den B-Zellen von Mäusen gewonnen werden. Hierzu wird die Milz entnommen und die B-Zellen werden mit Myelomzellen zu sogenannte Hybridomzellen fusioniert. Daraus ergeben sich einzelne langlebige Zelllinien, die ausschließlich eine Antikörpersorte sezernieren. Diese können aus dem Zellkulturmedium isoliert und gereinigt werden^[3, 4].

Forschungsarbeiten an der BAM sollen dazu führen, die Selektion der richtigen Klone durch Anwendung der Durchflusszytometrie zu erleichtern^[5]. Häufig wird in der Phase der Immunogensynthese ein Spacer zwischen den Analyten und dem Trägerprotein geschaltet. Wird kein Spacer verwendet, oder ist dieser zu kurz, kann es zu Abschirmeffekten durch das Trägerprotein kommen. Zu lange Spacer könnten sich in sich selbst zurückfalten und die Zielstruktur des Antikörpers verändern. Ein Spaceroptimum liegt bei Alkylspacern wohl bei ca. sechs Kohlenstoffatomen^[6]. Es existieren Antikörper gegen eine Vielzahl von pharmakologisch aktiven Substanzen, z.B. Koffein^[7], Carbamazepin^[8] oder Isolithocholsäure^[9]. Eine wichtige Umweltkontaminante ist Diclofenac (Struktur in Abbildung 1), welches in zahlreichen Gewässern mittels LC-MS und GC-MS nachgewiesen werden konnte und auf der Beobachtungsliste zur EU-Wasserrahmenrichtlinie steht^[1, 10].

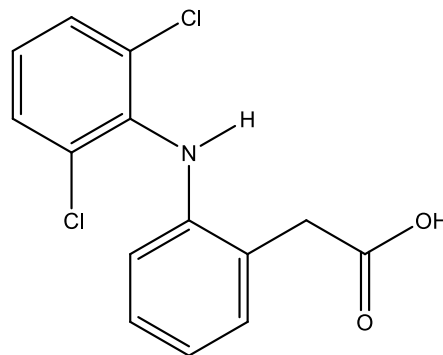


Abb.1: Diclofenac (DCF)

Diclofenac hat ökotoxikologische Wirkungen. So wurde durch Anreicherung in der Nahrungskette ein Massensterben von Geiern in Indien ausgelöst^[11]. Bisher existiert ein polyklonaler Antikörper gegen Diclofenac, der die Messung in Umweltproben ermöglicht^[2]. Kürzlich wurde auch die Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers publiziert^[12]. Alle diese Antikörper basieren auf direkter Kopplung an das Protein über die Carboxylfunktion des Diclofenac. Durch die Einführung eines Spacers werden allerdings selektivere und ggf. affinere Antikörper erwartet. In wässrigen Proben liegt Diclofenac als Anion vor. Kommerziell ist es als Natriumsalz erhältlich. Als

freie Carbonsäure oder in aktivierter Form tritt Cyclisierung ein (Abbildung 2), was chemische Reaktionen, wie z.B. die Synthese neuer Diclofenac-Haptene, erschwert. Photoabbauprodukte^[13] sind neben physiologischen Metaboliten^[14] vermutlich relevante Kreuzreaktanden. Deshalb werden auch Photoabbauprodukte produziert. Mit Antikörpern lassen sich außerdem Immunaффinitätssäulen herstellen. Diese erlauben eine selektive Aufkonzentrierung des Analyten aus einer Probe.

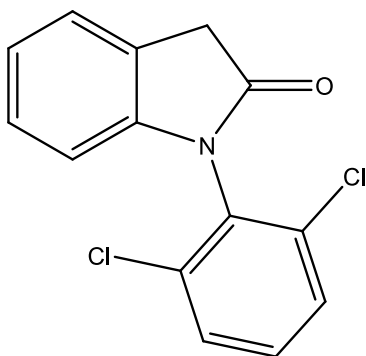


Abb. 2: Cyclisierungsprodukt des Diclofenac

Chemische Synthese

Es konnte ein Hapten synthetisiert werden, bei dem es sich um ein Amid aus Diclofenac und 6-Aminohexansäure (Ahx) handelt (Abbildung 3). Das Produkt (DCF-Ahx) konnte ausschließlich durch Festphasensynthese am Fmoc-Ahx-Wang-Harz hergestellt werden. Aufgrund der geringen erwarteten Ausbeute wurden 5 g Harz in einer Glassäule als Reaktor eingesetzt. Die Reinigung des vom Harz abgespaltenen Rohproduktes erfolgte zunächst säulenchromatographisch über Kieselgel. Das immer noch verunreinigte Hapten wurde im zweiten Schritt durch HPLC aufgereinigt. Die Kopplung von DC bzw. der Haptene DCF-Ahx und Aceclofenac (ACF; s. Abbildung 4), erfolgte nach NHS-Aktivierung an Rinderserumalbumin (BSA), Ovalbumin (OVA) und Apotransferin als Trägerproteine bzw. Meerrettichperoxidase zur Verwendung als Enzymtracer im Immunoassay. Zur Aufreinigung der Proteinkonjugate kam Größenausschlusschromatographie zum Einsatz. Mittels Flugzeitmassenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) wurden die Kopplungsdichten bestimmt.

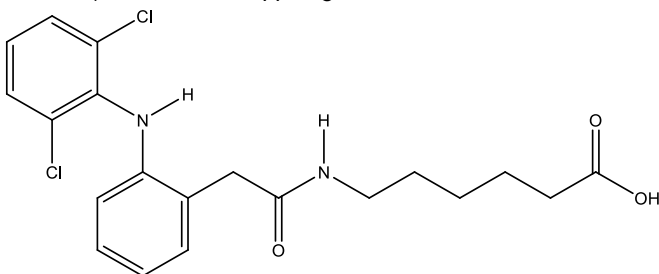


Abb. 3: Festphasensyntheseprodukt DCF-Ahx

Ergebnisse und Diskussion

Die Cyclisierung von Diclofenac als freie Carbonsäure oder in aktivierter Form erschwert Synthesen ausgehend vom Wirkstoff erheblich. Allerdings lässt sich DCF leicht verestern. Dies ermöglicht theoretisch den Einsatz von Organometallchemie am Methylester oder am Natriumsalz. Allerdings ist unter derart basischen Bedingungen keine Diclofenac-Verbindung über längere Zeit stabil. Letztendlich wird meist nur das Cyclisierungsprodukt isoliert. Der Einsatz von Festphasensynthesen ermöglicht die Einführung von Aminosäuren als Spacer. Vorteilhaft ist, dass sämtliche Verunreinigungen von der Festphase gewaschen werden können. Die resultierenden Verunreinigungen stammen allesamt von Spaltrückständen des Harzes, die sich nahezu vollständig durch zweistufige Aufreinigung entfernen lassen. Die Ausbeuten sind letztendlich niedrig, aber reproduzierbar.

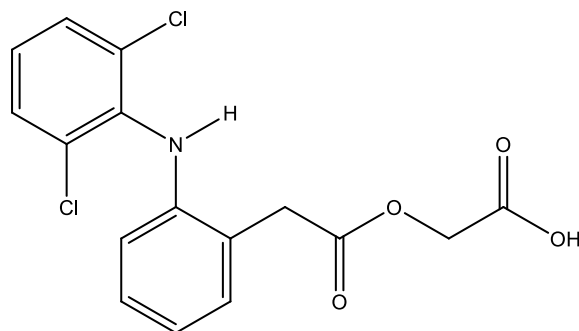


Abb. 4: Aceclofenac (ACF)

Weiterhin konnte mittels eines kommerziell erhältlichen polyklonalen anti-DCF-Antikörpers^[1,15] die Funktionalität eines Ovalbumin-Konjugats von DCF validiert werden. Es wurde ein indirekter ELISA etabliert mit einem Testmittelpunkt (x-Koordinate, d.h. Konzentrationswert am Wendepunkt der Kalibrierkurve) von 68 ng/L (Abbildung 5).

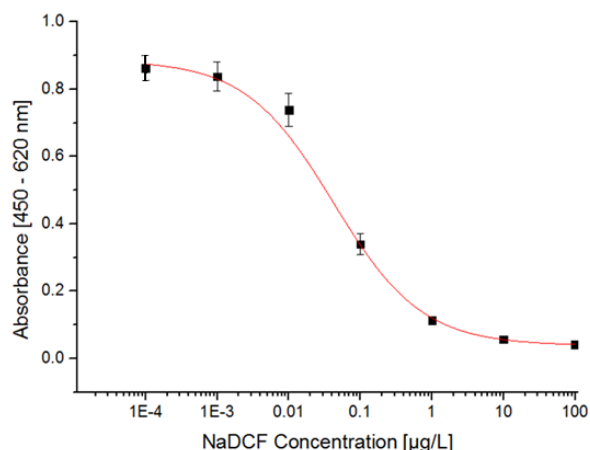


Abb. 5: Referenz-ELISA, basierend auf einem kommerziell erhältlichen polyklonalen Antikörper^[1, 15]

Sowohl DCF als Kontrolle, als auch DCF-Ahx und ACF wurden bereits in Immunisierungen eingesetzt. Als Trägerprotein wurde BSA verwendet. In Optimierungsversuchen zur Kopplung konnte gezeigt werden, dass eine zweite Behandlung von BSA mit dem NHS-Ester zu einer drastischen Zunahme der Kopplungsdichten führt. Immunisierungen mit verschiedenen Immunogenen laufen.

Ausblick

Derzeit werden die bereits erfolgten Immunisierungen auf brauchbare Antikörper untersucht. Ziel ist die Entwicklung eines Immunoassays. Dieser sollte nach Möglichkeit ein direkter Assay sein, da direkte Assays meist sensitiver im Vergleich zu indirekten sind^[16]. Für Kreuzreaktivitätsuntersuchungen wird versucht, durch Bestrahlung einer hochkonzentrierten DCF-Lösung Photoabbauprodukte zu gewinnen. Gleichzeitig wird eine auf HPLC-MS/MS basierende Referenzanalytik entwickelt. Um stärkere Immunreaktionen zu erhalten, wird ein Verfahren zur Bestimmung der Kopplungsdichte von Haptenen an KLH, ein hochmolekulares und hochimmunogenes Protein (Hämocyanin der Schlüssellocknapfschnecke, keyhole limpet) entwickelt, um dieses als Immunogen sicherer nutzbar zu machen.

Literatur

- [1] C. Tixier, H. P. Singer, S. Oellers, and S. R. Müller, Occurrence and fate of carbamazepine, clofibrac acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. *Environmental Science and Technology* 37 (2003) 1061-1068.
- [2] A. Deng, M. Himmelsbach, Q.-Z. Zhu, S. Frey, M. Sengl, W. Buchberger, R. Niessner and D. Knopp, Residue analysis of the pharmaceutical diclofenac in different water types using ELISA and GC/MS. *Environmental Science and Technology* 37 (2003) 3422-3429.
- [3] A. C. Moser and D.S. Hage, Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments. *Bioanalysis* 2 (2010) 769-790.
- [4] G. Giraudi and C. Baggiani, Strategy for fractionating high-affinity antibodies to steroid hormones by affinity chromatography. *Analyst* 121 (1996) 939-944.
- [5] M. Kuhne, M. Dippong, S. Flemig, K. Hoffmann, K. Petsch, J. A. Schenk, H. J. Kunte and R. J. Schneider, Comparative characterization of mAb producing hapten-specific hybridoma cells by flow cytometric analysis and ELISA. *Journal of Immunological Methods* 413 (2014) 45-56.
- [6] C. Keuchel, L. Weil, and R. Niessner, Effect of the variation of the length of the spacer in a competitive enzyme immunoassay (ELISA) for the determination of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 343 (1992) 143-143.
- [7] J. J. Carvalho, M. G. Weller, U. Panne, and R. J. Schneider, A highly sensitive caffeine immunoassay based on a monoclonal antibody. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396 (2010) 2617-2628.
- [8] L. Oberleitner, S. A. Eremin, A. Lehmann, L.-A. Garbe and R. J. Schneider, Fluorescence polarization immunoassays for carbamazepine – comparison of tracers and formats. *Analytical Methods* 7 (2015) 5854-5861.
- [9] S. Gärtner, J. J. Carvalho, F. Emmerling, L.-A. Garbe and R. J. Schneider, Polyclonal murine and rabbit antibodies for the bile acid isolithocholic acid. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry* 36 (2015) 233-252.
- [10] Water Framework Directive; Proposal for a Directive amending the WFD and EQSD [COM(2011)876] and Report [COM(2011)875].
- [11] M. Saini, M. A. Taggert, D. Knopp, S. Upreti, D. Swarup, A. Das, P. K. Gupta, R. Niessner, V. Prakkash, R. Mateo and R. J. Cuthbert, Detecting diclofenac in livestock carcasses in India with an ELISA: A tool to prevent widespread vulture poisoning. *Environmental Pollution* 160 (2012) 11-16.
- [12] M. Huebner, E. Weber, R. Niessner, S. Boujday and D. Knopp, Rapid analysis of diclofenac in freshwater and wastewater by a monoclonal antibody-based highly sensitive ELISA. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (2015) 1-10.
- [13] H.-R. Buser, T. Poiger, and M. D. Müller, Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a lake. *Environmental Science and Technology* 32 (1998) 3449-3456.
- [14] V. Osorio, Simultaneous determination of diclofenac, its human metabolites and microbial nitration/nitrosation transformation products in wastewaters by liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1347 (2014) 63-71.
- [15] <http://www.antikoerper-online.de/antibody/289631/anti-Diclofenac/>
- [16] J. Grandke, L. Oberleitner, U. Resch-Genger, L.-A. Garbe and R. J. Schneider, Quality assurance in immunoassay performance – comparison of different enzyme immunoassays for the determination of caffeine in consumer products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 1601-1611.