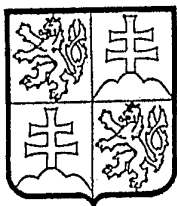


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS 276 445

(21) Číslo přihlášky : 3470-90.U

(22) Přihlášeno : 12 07 90

(30) Prioritní data :

(13) Druh dokumentu : B5

(51) Int. Cl.⁵ :

C 12 N 5/20

(40) Zveřejněno : 15 01 92

(47) Uděleno : 20 03 92

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 13 05 92

- (73) Majitel patentu : ČÁP JAN MUDr.,
STRAKOVÁ HANA RNDr.,
JIRKALOVÁ VELESLAVA PhMr.,
PRIBYŠOVÁ JAROSLAVA RNDr., HRADEC KRÁLOVÉ,
LOMSKÝ RADOVAN MUDr., PRAHA
- (72) Původce vynálezu : ČÁP JAN MUDr.,
STRAKOVÁ HANA RNDr.,
JIRKALOVÁ VELESLAVA PhMr.,
PRIBYŠOVÁ JAROSLAVA RNDr., HRADEC KRÁLOVÉ,
LOMSKÝ RADOVAN MUDr., PRAHA

- (54) Název vynálezu : Myši lymfocytární hybridom TSH-51, produkující monoklonální protilátku třídy IgG2a proti lidskému thyreostimulačnímu hormonu

(57) Anotace :

Řešení se týká myšního lymfocytárního hybridomu TSH-51 produkujícího protilátku třídy IgG 2a proti lidskému thyreostimulačnímu hormonu. Samotná monoklonální protilátka hybridomu TSH-51 je vhodná pro použití k sensitive a specifické detekci hladiny thyreostimulačního hormonu imunochemickými metodami typu imunoradiometrické analýzy, jakož i k histochemickému průkazu thyreostimulačního hormonu na tkáňových řezech a buňkách na úrovni optického a elektronového mikroskopu a při purifikaci proteinů metodou imunoafinitní chromatografie.

Vynález se týká nového hybridomu, tj. hybridního jednobuněčného organismu, sestaveného buněčnou fúzí myší myelomové linie P3-X63-Ag8.653 a myší slezinové lymfocytární buňky produkující protilátku proti lidskému thyreostimulačnímu hormonu (TSH).

Doposud se protilátky proti thyreostimulačnímu hormonu (TSH) vyrábějí tak, že je thyreostimulační hormon opakovaně injikován (zpravidla spolu s adjuvans) pokusným zvířatům, a to nejčastěji králíkům. Sérum takto imunizovaných zvířat, odebrané po určité době působení antigenu, slouží jako zdroj protilátek, užívaných zejména pro stanovení hladiny thyreostimulačního hormonu v séru metodou radioimunoanalýzy (RIA) a pro průkaz přítomnosti thyreostimulačního hormonu ve tkáních. Tento postup nazývaný konvenční imunizací, má několik nevýhod. V séru imunizovaných zvířat se nachází heterogenní směs protilátek, jejichž spektrum je v každém jednotlivém organismu různé a neopakovatelné. V případě antisér proti thyreostimulačnímu hormonu je situace ještě komplikována tím, že thyreostimulační hormon má polovinu molekuly (alfa subjednotku) identickou s alfa subjednotkou jiných glykoproteinových hormonů hypofýzy (luteinizační hormon - LH a folikuloestimulační hormon - FSH) a placenty (lidský choriový gonadotropin - HCG), takže vzniklá antiséra zkříženě reagují se všemi těmito hormony. Tyto nežádoucí reakce je nutno odstraňovat složitým způsobem, zvaným vysycování. Výrobní šarže konvenčních antisér se proto dají jen velmi nesnadno standardizovat a vycházejí z výroby v širokém rozmezí kvality. Pro výrobu každé šarže je třeba připravit značně čistý imunizační antigen a další antigeny pro vysycení balastních protilátek proti podobným molekulám, zejména výše uvedeným glykoproteinovým hormonům.

V ČSFR byly připraveny lymfocytární hybridomy produkující protilátky proti thyreostimulačnímu hormonu. Tyto protilátky však mají příliš nízkou asociační konstantu a proto nejsou použitelné pro imunochemické stanovení hladiny thyreostimulačního hormonu v tělečných tekutinách s dostatečnou citlivostí. Ve světové literatuře jsou popsány hybridomy produkující protilátky proti thyreostimulačnímu hormonu s dostatečnou afinitou. Rozšíření jejich palety by umožnilo nalézt další vzájemné kombinace protilátek vhodných ke stanovení thyreostimulačního hormonu, například metodou imunoradiometrické analýzy.

Uvedené nedostatky odstraňuje a rozšiřuje paletu monoklonálních protilátek vhodných ke stanovení thyreostimulačního hormonu hybridom podle vynálezu, produkující protilátku proti lidskému thyreostimulačnímu hormonu, který je uložený ve sbírce hybridomů Vědeckého střediska pro hormonální proteiny a peptidy Lékařské fakulty University Karlovy v Hradci Králové, Šimkova 870, pod označením TSH-51.

Uvedený hybridom byl získán způsobem známým z odborné literatury (Campbell, A.M.: Monoclonal antibody technology. Elsevier, 1984, Goding, J.W.: Monoclonal antibodies: Principles and practice, Second ed., Academic Press, 1986) klonováním souboru hybridních buněk, vzniklých fúzí buněk myší myelomové linie P3-X63-Ag8.653 a buněk, získaných ze sleziny myši kmene BALB/c, imunizovaných lidským thyreostimulačním hormonem izolovaným z hypofýzy.

Výhodou lymfocytárního hybridomu TSH-51 je, že produkuje zcela homogenní protilátku, tzv. protilátku monoklonální, která je schopna specificky reagovat s lidským thyreostimulačním hybridomem. Hybridom TSH-51 je možno kultivovat in vitro v médiích vhodných pro pěstování živočišných buněk nebo v podmínkách in vivo v peritoneální dutině myši kmene BALB/c. Hybridom TSH-51 je vhodný k dlouhodobému uchovávání v konzervách uložených v kapalném dusíku. Produkci monoklonální protilátky je možno zahájit po rozmražení buněčné konzervy, aniž by bylo třeba dalšího antigenu. Protilátka produkovaná hybridomem TSH-51 je specifická výhradně pro thyreostimulační hormon, nereaguje s ostatními glykoproteinovými hormony. Průkaz byl proveden vazbou hormonů značených izotopem jodu 125 na tuto protilátku jednak v systému radioimunoanalýzy (RIA) na pevné bázi (tab. 1), jednak v klasickém RIA systému se separací pomocí druhé protilátky (tab. 2). Určitá vazba na protilátku byla zjištěna jen v případě folikuloestimulačního hormonu a zejména luteinizačního hormonu, toto však lze vysvětlit tím, že oba použité preparáty nejsou zcela čisté a obsahují určité

množství thyreostimulačního hormonu. Že nejde o zkříženou reakci protilátky dokazují výsledky zjištěné v systému imunoradiometrické analýzy (IRMA) jak bude uvedeno dále. Asociační konstanta monoklonální protilátky TSH-51 byla určena za použití systému radioimunoanalýzy s druhou protilátkou tak, že byla zjišťována vazba snižující se koncentrace mezinárodního standardu TSH IRP 80/558 s přidavkem značeného hormonu. Ke 100 mIU/l IRP 80/558 bylo přidáno takové množství značeného thyreostimulačního hormonu, aby bylo dosaženo aktivity 100 000 cpm. Při stanovení byl použit tento materiál a řada 8 dvojnásobných ředění. Při výpočtu asociační konstanty byla zahrnuta i koncentrace traceru zjištěná metodou vnitřního standardu. Na základě těchto měření byla zjištěna asociační konstanta protilátky $5,5 \cdot 10^{10}$ l/mol.

Protílátka produkovaná hybridomem TSH-51 spojuje specifitu vazby lidského thyreostimulačního hormonu s vysokou asociační konstantou. Tyto charakteristiky umožňují při jejím použití zkonstruovat systém imunoradiometrické analýzy (IRMA) pro stanovení hladin thyreostimulačního hormonu v séru, který je striktně specifický (tj. není ovlivněn ani vysokými hladinami příbuzných hormonů například v těhotenství) a má velmi nízký detekční limit (tj. umožňuje rozpoznání snížených hladin thyreostimulačního hormonu a použití mikrometod při screeningu novorozenců).

Příklad 1

Pro pomnožení hybridomových buněk in vivo bylo aplikováno 1×10^6 buněk do peritoneální dutiny myši BALB/c. Pro lepší uchycení injikovaných buněk byla myš týden před přenosem buněk hybridomu ovlivněna parafinovým olejem (0,5 ml intraperitoneálně). Po 14 dnech růstu hybridomu byla odebrána ascitická tekutina a tento odběr byl opakován ob den celkem třikrát. Celkem bylo získáno 16 ml ascitické tekutiny, která obsahovala 8 mg/ml imunoglobulinu. Z této ascitické tekutiny byla izolována čistá monoklonální protílátka chromatografií na komplexu protein A-Sepharose CL-48 a adsorbována na pevnou fázi zkumavek takto: Vnitřní povrch polystyrenových zkumavek Koh-i-noor byl upraven působením 1% roztoku glutaraldehydu ve vodě po dobu 4 h a po promytí zkumavek byl aplikován roztok izolované monoklonální protilátky produkované hybridomem TSH-51 ve fyziologickém roztoku s fosfátovým pufrem (PBS) pH 7,5 o koncentraci 5 µg/ml přes noc. Po promytí byla zbývající vazebná místa blokována roztokem bovinního sérového albuminu v PBS, pH 7,5 v koncentraci 1 % hmot. Zkumavek se zakotvenou protilátkou produkovanou hybridomem TSH-51 bylo použito pro stanovení hladiny TSH v séru. Do zkumavek bylo pipetováno 200 µl standardu o známé koncentraci TSH nebo vyšetřovaného vzorku, po hodinovém třepání při pokojové teplotě byl materiál odsát, zkumavka jednou propláchnuta pufrem PBS, pH 7,5 a v dalším kroku bylo pipetováno 200 µl roztoku jiné monoklonální protilátky s kódovým označením TSH-116 označené jodem 125 v roztoku albuminu v pufru PBS, pH 7,5 o koncentraci 5 % hmot. Koncentrace značené protilátky TSH-116 byla připravena tak, aby počet impulzů byl 60 000 za minutu ve 200 µl. Po inkubaci značené protilátky přes noc byly zkumavky po odsátí dvakrát promyty pufrem PBS, pH 7,5 a zakotvená radioaktivita měřena na gamapočítací. Výsledky zjištěné se standardy o známé koncentraci TSH shrnuje kalibrační křivka, imunoradiometrického systému (IRMA) za použití protilátky TSH-51. Přerušovaná čára udává absolutní počet impulzů značené protilátky vázaných na pevnou fázi, plná čára počet impulzů po odečtení nespecifické vazby nulového vzorku ("blanku"). Průměrné hodnoty blaku při měření dvaceti zkumavek a pásmo 2 směrodatných odchylek nad tímto průměrem jsou znázorněny šrafovaným pásem. Radioaktivita odpovídající kalibračnímu bodu 0,05 mIU/l je na horní hranici tohoto pásma a představuje tak detekční limit esaje. Byl zjištěn velmi nízký detekční limit stanovení - 0,05 mIU/l TSH. Dále bylo zjišťováno, jaké hodnoty budou v tomto systému stanovení imunoradiometrické analýzy (IRMA) zjištěny při použití roztoků dalších hormonů o známé koncentraci a jak tento přírůstek jiných hormonů ovlivní výsledek stanovení hladiny TSH. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 3. Systém IRMA nebyl ovlivněn použitými koncentracemi HCG a PRL, jedině mezinárodní standard LH IRP 68/40 v koncentraci 160 IU/l vykazoval odečitatelnou hodnotu TSH (0,09 mIU/l). Standard však obsahuje podle

údajů Světové zdravotnické organizace (WHO) 0,1 mIU TSH na 77 IU LH; tj. 0,129 % celkového množství LH a stanovená hodnota tak odpovídá přítomnosti TSH ve vzorku.

Příklad 2

Byly připraveny zkumavky se zakotvenou protilátkou produkovanou hybridomem TSH-51 stejně jako v příkladu 1. Do zkumavek byly umístěny terčíky filtračního papíru se zaschlou krví o známé koncentraci TSH určené pro kalibraci kitu pro screening novorozenecké hypothyreosy firmy Pharmacia. Na terčíky bylo pipetováno 200 ul roztoku jiné protilátky s kodovým označením TSH-61 označené jodem 125 v roztoku PBS, pH 7,5 s obsahem 0,1 % hmot. bovinního sérového albuminu. Koncentrace jodované protilátky TSH-61 byla taková, že 200 ul roztoku mělo aktivitu 60 000 impulzů za minutu. Po 24 hodinách inkubace byla tekutina odsáta, zkumavky dvakrát promyty roztokem PBS, pH 7,5 a navázaná radioaktivita měřena na gamapočítači. Ke kalibraci byly přidány dvě skvrny kontrolních krví. Výsledky jsou uvedeny na obr. 2, který znázorňuje kalibrační křivky systému IRMA pro stanovení TSH z krevních skvrn na papíře v rámci screeningu novorozenecké hypothyreosy. Čárkovanež je zakreslena kalibrační křivka zahraničního kitu dosud používaného, jak je uvedena výrobcem. Plnou čarou je uvedena kalibrační křivka při použití protilátky TSH-51, která je strmější což umožňuje citlivější stanovení. Je zřejmé, že popsaný systém je citlivější než dosud používaný kit zahraniční výroby. Výsledky zjištěné v kontrolních krevních skvrnách se shodovaly s hodnotami deklarovanými.

Buňky hybridomu TSH-51 mají morfologický charakter typických myelomových buněk. V podmínkách in vitro rostou v podobě polosuspendních kultur. Základním kultivačním médiem je Dulbeccova modifikace minimálního esenciálního média (DMEM) doplněná L-glutaminem (2 mM), penicilinem, streptomycinem a inaktivovaným fetálním telecím sérem. Hybridom je kultivován při 37 °C v atmosféře 5 obj. % kyslíčnicku uhlíčitého a jeho střední generační čas je 16 hodin. Produkovaná protilátka je myší monoklonální imunoglobulin třídy IgG 2a, specificky vážící lidský TSH s vysokou afinitou (asociační konstanta v systému RIA $5,5 \cdot 10^{10}$ l/mol). Modální počet chromozomů hybridomu 6 měsíců po ustavení byl 86.

Monoklonální protilátka, produkovaná hybridomem TSH-51 je použitelná pro vysoce senzitivní a striktně specifické stanovení koncentrace TSH v lidském séru imunochemickými metodami (imunoradiometrická analýza, imunoenzymometrická analýzy atd.), jednak při diagnostice poruch funkce štítné žlázy u dospělých (včetně možnosti stanovit snížené hladiny), jednak při screeningu novorozenecké hypothyreosy u všech novorozenců. Je využitelná i pro průkaz thyreostimulačního hormonu ve tkáních imunohistochemickými metodami a při purifikaci hormonálních proteinů imunoafinitní chromatografií. Nalezne uplatnění v lékařství a preparativní biochemii.

Vazba značených hormonů na monoklonální protilátku produkovanou hybridomem TSH-51 zakotvenou na pevné fázi je vyjádřena v procentech celkového množství inkubovaného hormonu po odečtení nespecifické vazby. Koncentrace protilátky na pevné fázi je (jak vyplývá z vysokého procenta vazby TSH-J¹²⁵) vysoká.

Hormon	Vazba v procentech
TSH	68,6
LH	2,99
FSH	0,66
HCG	0,03

Tabulka č. 2

Vazba značených hormonů při použití monoklonální protilátky produkované hybridomem TSH-51 ve třech různých ředěních (titrech) v klasickém RIA systému se separací pomocí druhé protilátky. Vazba je uvedena v procentech celkového množství značeného hormonu po odečtení nespecifické vazby.

Hormon	Ředění protilátky		
	1:500	1:10 000	1:100 000
TSH	62,8	50,0	13,7
FSH	0,7	0,4	0
LH	4,3	3,0	1,1
HCG	0,04	0	0
PRL	0	0	0
HGH	0	0	0

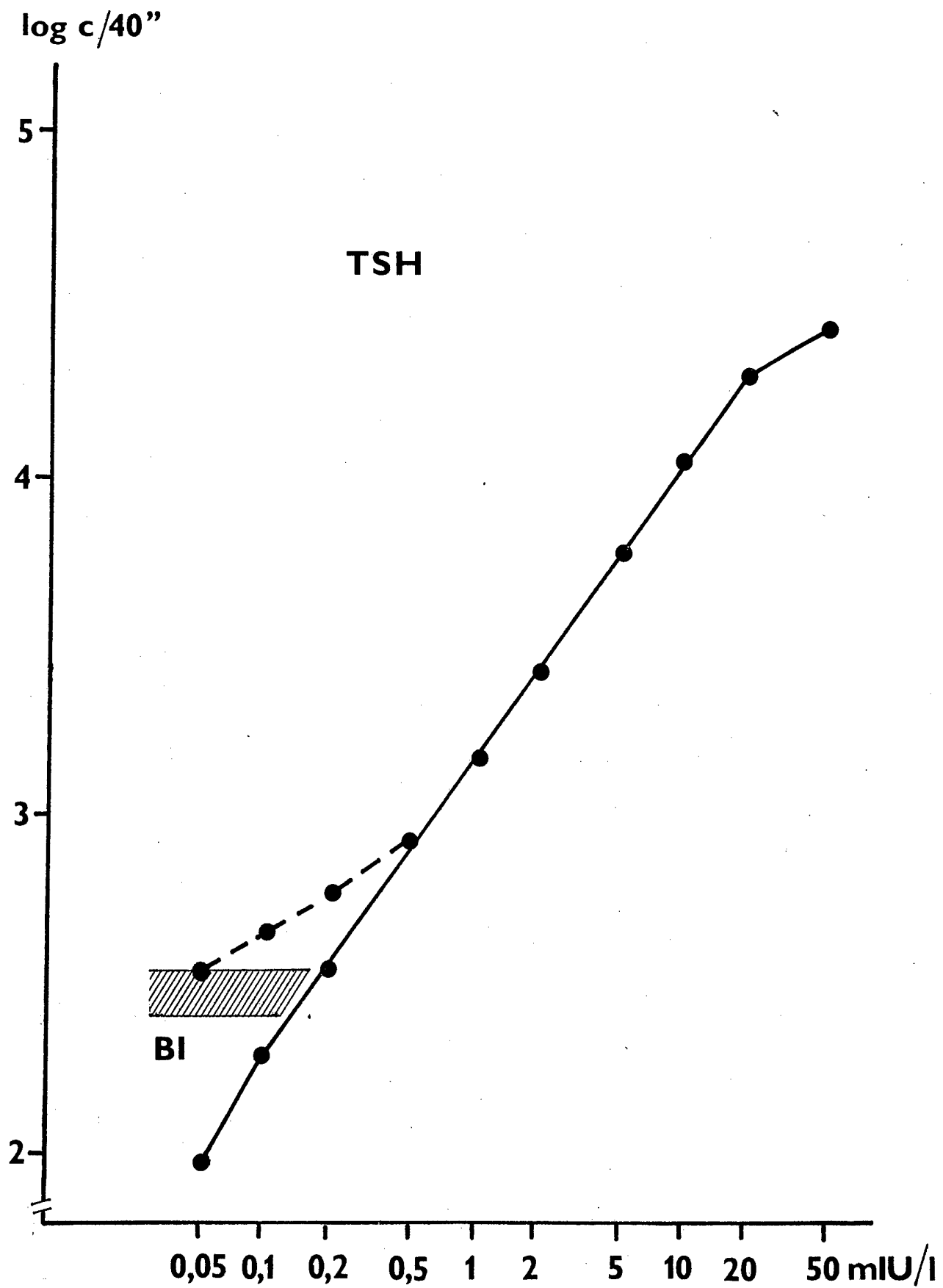
Použité zkratky: TSH - thyreostimulační hormon, FSH - folikulostimulační hormon, LH - luteinizační hormon, HCG - lidský choriový gonadotropin, PRL - lidský prolaktin, HGH - lidský růstový hormon.

Zkřížené reakce při stanovení hladiny TSH metodou IRMA za použití protilátky produkované hybridomem TSH-51. Jsou uvedeny stanovené hladiny TSH v roztoku standardů HCG, LH a PRL jednak bez přidání TSH, jednak s přidavkem známé koncentrace standardu TSH. Mezinárodní standard LH IRP 68/40 obsahuje dle údajů WHO 0,129 % TSH.

Standard		Stanovená hodnota TSH mIU/l
HCG 10 000 IU/l		méně než 0,05
-"-	+ 2 mIU/l TSH	2,0
-"-	+16 mIU/l TSH	16,0
LH 160 IU/l		0,09
-"-	+ 2 mIU/l TSH	2,1
-"-	+16 mIU/l TSH	16,0
PRL 200 ng/ml		méně než 0,05
-"-	+30 mIU/l TSH	30,0

PATENTOVÉ NÁROKY

Myši lymfocytární hybridom TSH-51, produkující monoklonální protilátku třídy IgG 2a proti lidskému thyreostimulačnímu hormonu.

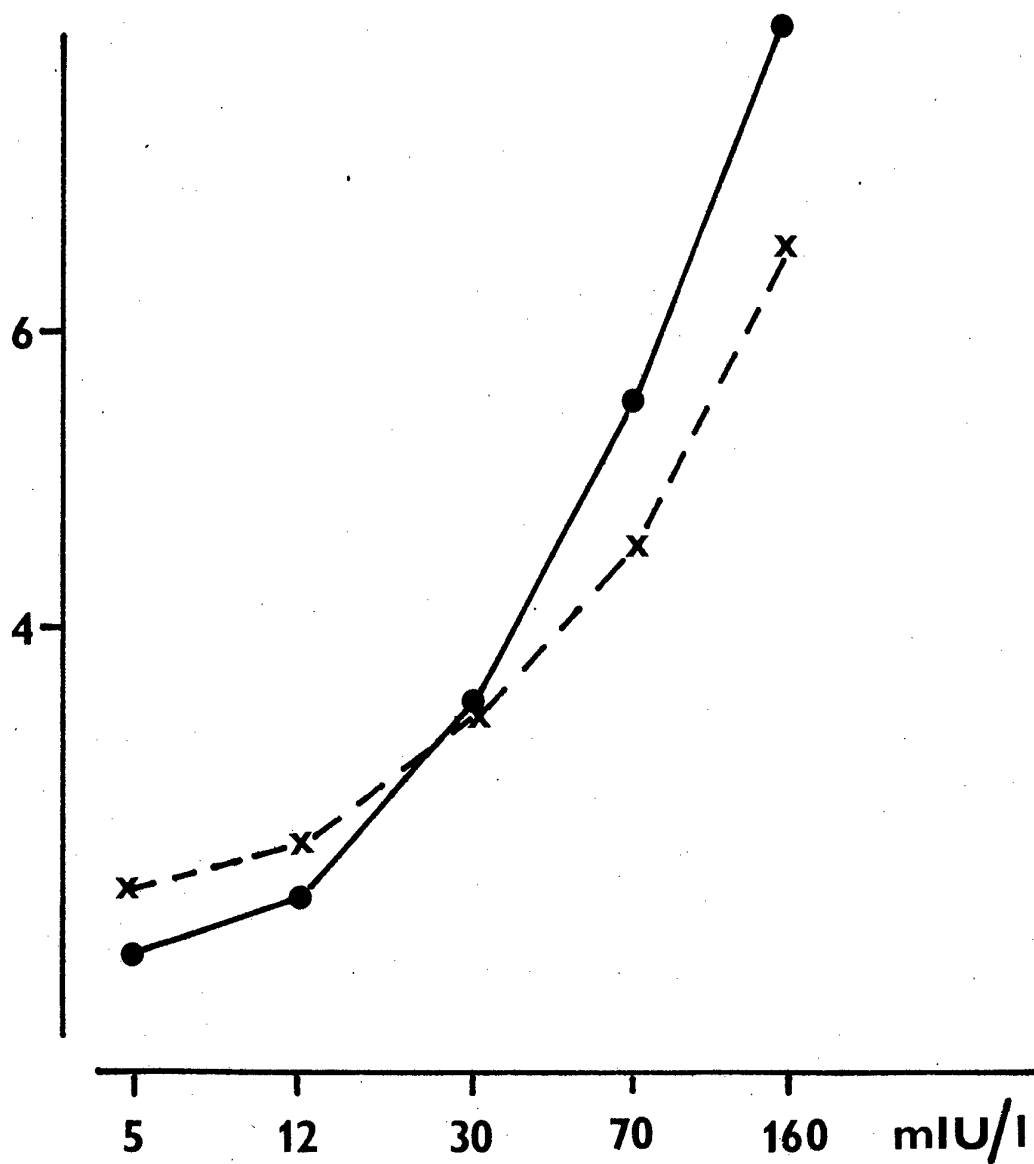


OBR. 1

● ——— HK

x - - - - Pharmacia

cpm 10^3



OBR. 2