

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

211 054 B

(21) A bejelentés ügyszám: 767/91
(22) A bejelentés napja: 1991. 03. 08.
(30) Elsőbbségi adatok:
00762/90 1990. 03. 09. CH
03378/90 1990. 10. 23. CH
(83) Letétbe helyezés: ECACC 9002 1701

(51) Int. Cl.⁶

C 12 N 15/02
C 12 P 21/08
C 07 K 16/28
G 01 N 33/53

(40) A közzététel napja: 1993. 01. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1995. 10. 30.

(72) Feltalálók:

dr. Moser, Hans, Magden (CH)
dr. Ramsteiner, Klaus, Hofstetten (CH)
dr. Schlaeppli, Jean-Marc, Bazel (CH)

(73) Szabadalmas:

CIBA-GEIGY AG., Bazel (CH)

(74) Képviselő:

S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda, Budapest

(54) **Eljárás és teszt-kit metolaklór immunológiai kimutatására, valamint eljárás hibridóma-sejtvonal és monoklonális antitestek előállítására metolaklór immunológiai kimutatásában való felhasználáshoz**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás és teszt-kit metolaklór immunológiai kimutatására, valamint eljárás hibridóma-sejtvonal és monoklonális antitestek előállítására metolaklór immunológiai kimutatásában való felhasználáshoz.

A találmány értelmében azt a hibridóma-sejtvonalat, amely olyan monoklonális antitesteket termel, mely antitestek metolaklór iránt nagy fajlagosságot és affinitást mutatnak, és lényegében semmilyen keresztreaktivitást nem mutatnak a legismertebb, szerkezetileg rokon metolaklór-analógokkal, úgy állítják elő, hogy

- i) egy hapténként szolgáló metolaklórszármazékot szintetizálnak és egy vivőanyag-molekulával konjugálnak,
- ii) egy donorállatot az így kapott konjugátummal immunizálnak,

- iii) egy immunkompetens B-sejtet izolálnak az immunizált donorállatból,
- iv) az említett immunkompetens B-sejtet egy folytonos sejtosztódásra képes tumor-sejtvonallal fuzionálják,
- v) a keletkező hibridsejteket elkülönítik, alkalmas tápközegben tenyésztik, majd a pozitív hibridsejteket klónozzák, és
- vi) a klónozott hibridómák közül szelektálják a metolaklór felismerő monoklonális antitesteket termelő sejteket.

A megfelelő hibridóma-sejtvonalak in vivo vagy in vitro tenyésztésével kapott monoklonális antitestek metolaklór kimutatására szolgáló teszt-kitben és metolaklór kimutatási eljárásában alkalmazhatók.

A találmány tárgya eljárás és teszt-kit metolaklór immunológiai kimutatására, valamint eljárás hibridóma-sejtvonal és monoklonális antitestek előállítására, melyek felhasználhatók ehhez a kimutatáshoz.

A találmány tárgya közelebbről megjelölve eljárás olyan monoklonális antitestek előállítására, amelyek nagy mértékű szelektivitásukkal és metolaklórral szemben tanúsított aktivitásukkal tűnnek ki és ennélfogva kiválóan alkalmasak metolaklór gyors és hatásos kimutatására immunvizsgálat során.

A találmány kiterjed olyan hibridóma-sejtvonalak előállítására is, amelyek az említett monoklonális antitesteket termelik, továbbá immunológiai eljárásra metolaklór kimutatásához az említett monoklonális antitestek alkalmazásával, valamint az ilyen kimutatási eljárás során alkalmazható teszt-kitekerekre is.

Szintetikus herbicideknek a növényvédelemben való felhasználása és az ezzel összefüggésben álló környezetterhelés az utóbbi időben mind gyakrabban kerül a nyilvános viták középpontjába.

A metolaklór egy széles körben elterjedt herbicid hatóanyag, amely növényvédelem céljaira kerül felhasználásra, különösen kukorica-, gyapot-, burgonya- és cukorrépa-kultúrákban előforduló különböző vadon élő fűfélék szelektív irtására.

Kémiai szempontból tekintve a metolaklór esetében 2-klór-N-(2-etil-6-metil-fenil)-N-(2-metoxi-1-metil-etil)-acetamid, más néven a 2-klór-6'-etil-N-(2-metoxi-1-metil-etil)-acet-O-toluidid vegyületről van szó (The Pesticide Manual, 8th Edition, ed. by C. R. Worthing and S. B. Walker, The British Crop. Protection Council, Thornton Heath CR4, 7QG, UK, 1987, 568. és 569. oldal).

A metolaklór kimutatása talaj- és vízpróbákban manapság elsősorban gázkromatográfiával (GC) vagy folyadékkromatográfiával (például HPLC) történik [Hargrave HS és Merkle MG (1971); van Rensburg E (1985)].

Szintetikus herbicideknek valamennyi említett eljárással való kimutatása számos hátránnyal jár. Így például metolaklórnak talajpróbákban GC-vel vagy HPLC-vel történő meghatározásához a tulajdonképpeni kromatográfiás elemzés végrehajtása előtt költséges tisztító és koncentrálnó lépéseket kell beiktatni.

Ennek az eljárásnak a további hátránya az, hogy például a gázkromatográfiában elemspecifikus detektorokat használnak, míg a HPCL-nél olyan fotometriás detektorok kerülnek alkalmazásra, amelyek viszonylag nem specifikusak. A tömegspektroszkópiás kimutatás kivételével a kromatográfiás elemzések a mindenkori anyag retenciós idején alapszanak. Ezek az értékek azonban viszonylagosak és ezzel nem szerkezet-specifikusak.

Annak érdekében, hogy a bevezetett analitikai eljárások előzőekben leírt hátrányait kiküszöböljék, az utóbbi időben megkísérelték azt, hogy a mezőgazdaság számára is olyan immunológiai eljárásokat fejlesszenek ki, amelyek különösen jól használhatók a mezőgazdasági vegyszerek mennyiségi és minőségi meghatározására talaj-, víz- vagy levegőmintákban, és amilyeneket a klini-

kai diagnosztikában a legkülönbözőbb antigének kimutatására már rutinszerűen alkalmaznak.

Így például időközben megkezdtek immunológiai eljárások kifejlesztését bizonyos herbicidek, így 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav (Fleeker, 1986) vagy klórszulfuron (Kelley et al, 1985), valamint különböző peszticidek, így diflubenzuron (Wie és Hammock, 1982), metaxil (Newsome, 1985), alaklór (Feng et al, 1990) vagy paration (Ercegovich et al, 1981) kimutatására.

Atrazin immunológiai kimutatására is leírtak már egy eljárást a 4 530 786 számú USA-beli szabadalmi leírásban, amely azonban – ahogy az előzőekben említett módszerek – olyan poliklonális antiszérumokon alapszik, amelyeket állatokból nyernek ki, és amelyeket előzőleg megfelelő antigénnel immunizáltak.

A poliklonális antiszérumok összetételük tekintetében nagyon különböznek, azaz nagy számú különböző antitestet tartalmaznak, amelyek a mindenkor antigén különböző epitópjaival reagálnak. A poliklonális antiszérumoknak ez a heterogén összetétele azáltal jön létre, hogy valamely kísérleti állatnak egy bizonyos antigénnel történő immunizálásánál egyidejűleg egyre több antitestet termelő sejtklon stimulálódik, amelyekből mindegyik egy más epitópot ismer fel az antigén-molekulán és ezért a stimulált sejtklonok különböző antitesteket termelnek.

Ez okból a szérummal immunizált állatok mindig poliklonálisak és egyúttal heterogének mind fajlagosságuk, mind az immunglobulinok egyes osztályaihoz tartozásuk vonatkozásában.

Ez a heterogén jelleg a poliklonális antiszérumok összetételében ezért ahhoz vezet, hogy szerkezetileg közeli rokonságban lévő vegyületek, így például a metolaklór és az alaklór poliklonális antitestek alkalmazásánál valamely immunvizsgálat keretében nem elegendő mértékben tudnak differenciálódni.

Annak érdekében, hogy a poliklonális antiszérumoknak ezeket a hátrányait kiküszöböljék, az utóbbi időben egyre inkább arra törekedtek, hogy a mezőgazdaság számára antitesteket fejlesszenek ki. Így például Schlaeppi és munkatársai [J. Agric. Food. Chem., 37 1532–1538, (1989)] monoklonális antitestek előállításáról és ezeknek atrazin és hidroxil-atrazin elleni alkalmazásáról írnak enzimakapcsolós immunvizsgálatoknál. Metolaklórral szemben olyan monoklonális antitestek előállítása, amelyek kielégítően nagy affinitást mutatnak a célszállal szemben és ezzel alkalmasakká válnak a metolaklór kimutatására valamely ismert immunvizsgálatban, eddig még nem sikerült.

A feladat, amelyet e találmány keretében meg kívánunk oldani, elsősorban abban áll, hogy egyszerűen végrehajtható, hatásos és nagy mértékben szelektív immunvizsgálatot dolgozzunk ki metolaklórnak gyors és megbízható kimutatására talaj-, víz- és levegőmintákban, valamint biológiai anyag extraktumaiban.

A feladatot most a találmány keretében meglepő módon meg tudtuk oldani oly módon, hogy a metolaklórra nézve nagy fajlagosságú és affinitású monoklonális antitesteket állítunk elő az önmagában ismert hibridóma/monoklonális antitest-technológia alkalmazásával.

Hibrid, szomatikus sejtvonalak (hibridómák) alkalmazása, mint antitest-forrás egészen meghatározott antigének ellen Köhler és Milstein korábbi munkáira vezetnek vissza (Nature, 256: 495-97, 1975).

Azok az antitestek, amelyek az ott leírt eljárással nyerhetők, nagy mértékben különböznek azoktól, amelyek hagyományosan immunizált állatok antiszérumból kaphatók.

A hibridóma/monoklonális antitest-technológia azon a megfigyelésen alapszik, hogy két szomatikus sejt egybeolvadásánál a keletkező hibridsejtek mindkét szülőtípus jellegzetes ismertetőjegyeit mutatják.

A monoklonális antitest-termelés esetében a képesség fajlagos antitest szintéziséhez valamely immunkompetens B-sejttől (szokásosan egy lépsejtből) származik, amelyet egy előzőleg immunizált donorállatból vesznek ki. míg a képességet a folytonos sejtosztódáshoz a tenyésztésben a másik fúzióspartner által egy tumorsejtvonal (gyakran egy csontvelődaganat, myeloma) szolgáltatja.

E hibrid-sejtvonalak mindegyike szintetizál egy homogén immunglobulint, amely csupán egyetlen képviselő a lehetséges antitestek nagy számából, amelyet egy állat válaszként egy antigénre in vivo szintetizálni képes.

Mivel minden egyes immunglobulint termelő klónt az antitest egyetlen típusa jellemez, meghonosodott a monoklonális antitest megjelölés.

A monoklonális antitesteknek sok előnye van a poliklonális antitestekkel szemben, és ezek a következők:

- a) a monoklonális antitestek nagy számban és nagy tisztaságban kaphatók,
- b) a monoklonális antitestek előállítására homogén az antigénreaktivitás tekintetében és nem változik az idő előrehaladtával sem,
- c) a monoklonális antitesteket termelő hibridómák éveken át és évtizedeken keresztül megőrizhetők anélkül, hogy fajlagos tulajdonságaikat, például a fajlagos monoklonális antitest-termelő képességüket elveszítenék,
- d) a monoklonális antitestek jobban alkalmasak szabványos reagensként való alkalmazásra, mint a poliklonális antiszérumok, mivel az utóbbiakat nagy variációs lehetőség befolyásolja, tekintettel
- α) az immunizált állatok vérvételére az antiszérum kinyerése számára,
- β) az anyag állandó felhasználhatóságára pótlólagos immunizálásokhoz,
- γ) a donorállatok korlátozott életkorára.

A monoklonális antitestek, amelyeket időközben nagy számú antigén ellen állítottak elő, jól beváltak elsősorban az orvosi diagnosztikában.

A találmány keretében most először sikerült az ön-magában ismert és előzőleg röviden leírt hibridóma/monoklonális antitest-technológia alkalmazásával nagy fajlagosságú és a metolaktól herbicidre nézve olyan nagy aktivitású monoklonális antitesteket előállítani, amelyek fajlagosságuk és feltételezett csekély keresztreaktivitásuk alapján szerkezetileg rokon vegyületekkel szembevető módon immunvizsgálatnál a metolaktól gyors és megbízható kimutatására alkalmasak,

és amelyek ezáltal felhasználhatók a metolaktól megkülönböztetésére szerkezetileg rokon vegyületekkel vagy inaktív metabolitokkal szemben is.

A találmány így elsősorban olyan monoklonális antitestek és ezek származékainak előállítására vonatkozik, amelyek nagy fajlagosságot és affinitást mutatnak metolaktórral szemben és amelyek lényegében semmiféle keresztreaktivitást nem mutatnak a legismertebb metolaktól-analógokkal, különösen nem tanúsítanak keresztreaktivitást az alaktól metolaktól-analóggal.

A találmány keretében különösen előnyösek azok a monoklonális antitestek és származékaik, amelyek nagy mértékű fajlagosságot és affinitást mutatnak metolaktórral szemben, és amelyek olyan keresztreaktivitást mutatnak a legismertebb, szerkezetileg rokon vegyületekkel szemben, amely 10% alatt, különösen 2% alatt, elsősorban pedig 0,1% alatt van.

A találmány keretében monoklonális antitest-származékokon például olyan antitest-fragmenseket kell értenünk, amelyek még nagy fajlagossággal és affinitással rendelkeznek a metolaktól determinánsai számára, továbbá olyan radioaktív jelzésű monoklonális antitesteket, amelyek például radioaktív jelezésű monoklonális antitesteket, amelyek például radioaktív jóddal (^{125}J , ^{131}J), szénnel (^{14}C), kénnel (^{35}S), tríciummal (^3H) vagy hasonlókkal vannak jelölve, monoklonális antitestek konjugátumát biotinnal vagy avidinnal, enzimekkel, így torma-peroxidázzal, alkalikus foszfáttal, β -D-galaktozidázzal, glukozidázzal, glukozamilázzal, karbonsavanhidrázzal, acetilkolinszterázzal, lizozimmal, malata-dehidrogenázzal vagy glukóz-6-foszfát-dehidrogenázzal, továbbá monoklonális antitestek konjugátumát biolumineszkáló szerrel (például luciferázzal), kemilumineszkáló szerrel (például akridiniumészterrel) vagy fluoreszkáló anyaggal (például fikobiliproteinnel). Szintén a találmány körébe tartoznak bispecifikus, valamint úgynevezett „keresztkötésű” antitestek. A lehetséges antitest-származékoknak ez a példaszzerű felsorolása csupán a találmány bemutatására szolgál és a találmány oltalmi körét semmiféle módon nem korlátozza.

A „lényegében semmiféle keresztreaktivitás” megjelölésen a találmány keretében azt értjük, hogy a metolaktól számára fajlagos monoklonális antitesteknek a reagálóképessége más vegyületekkel, különösen a szerkezetileg rokon vegyületekkel, amelyek nem-specifikus epitópokkal rendelkeznek, 10%-nál kevesebb, előnyösen 2%-nál kevesebb és különösen 0,1%-nál kevesebb.

A keresztreaktivitás százalékos részarányát a találmány keretében definíciószerűen a következő összefüggés útján értékeljük:

$$\frac{\text{metolaktól-koncentráció } 50\% \text{ gátlás számára}}{\text{metolaktól-analógok koncentrációja } 50\% \text{ gátlás számára}} \times 100$$

Egy 50%-os gátlást például valamely kompetitív ELISA vizsgálattal (8. példa) határozzuk meg. Ez megfelel azután például annak az antigén-koncentrációnak, amely a vívőanyaghoz kötött antitestkötés 50%-os gátlásához vezet.

A találmány egy további tárgya olyan hibridóma-sejtvonalak előállítása, amelyek az előbb közelebb jellemzett monoklonális antitesteket szintetizálják és előnyösen a környező közegbe leválasztják.

A találmány különösen olyan hibridóma-sejtvonal előállítására vonatkozik, amely olyan monoklonális antitestet termel, amely nagy fajlagosságot és affinitást mutat a metolaklórral szemben, és amely lényegében semmiféle keresztreaktivitást nem mutat a legismertebb, szerkezetileg rokon vegyületekkel, különösen pedig nem tanúsít keresztreaktivitást az alaklórral.

Különösen előnyös egy olyan hibridóma-sejtvonal, amely olyan monoklonális antitestet szintetizál és választ le a környező közegbe, amely nagy fajlagosságot és affinitást tanúsít metolaklórral szemben, és amely olyan keresztreaktivitást mutat a legismertebb, szerkezetileg rokon metolaklór-analógokkal szemben, amely <10%, különösen <2% és elsősorban <0,1%.

Egészen különösen előnyös egy olyan hibridóma-sejtvonal, amelynek a jellemzői megfelelnek az ECACC 9002 1701-éinek, valamint ennek klónja és szubklónja.

A találmány kiterjed azoknak az előzőekben közelebbről jellemzett hibridóma-sejtvonalak variánsaira és mutánsaira is, amelyek spontán keletkeznek vagy mesterségesen, ismert eljárások segítségével állíthatók elő, és amelyek a kiindulási anyag jellegzetes tulajdonságait mutatják, azaz amelyek még abban a helyzetben vannak, hogy azokból a találmány szerinti antitesteket vagy azok származékait előállítsuk és a környező közegbe leválasszuk.

A találmány magában foglalja az említett hibridóma-sejtvonalak előállítására szolgáló eljárást, valamint az említett monoklonális antitestek előállítására alkalmas eljárást is.

Az említett hibridóma-sejtvonal – amely olyan monoklonális antitesteket termel, mely antitestek metolaklór iránt nagy fajlagosságot és affinitást mutatnak, és lényegében semmilyen keresztreaktivitást nem mutatnak a legismertebb, szerkezetileg rokon metolaklór-analógokkal – előállítása során a találmány értelmében úgy járunk el, hogy

- i) egy hapténként szolgáló metolaklór-származékot szintetizálunk és egy vivőanyag-molekulával konjugálunk,
- ii) egy donorállatot az így kapott konjugátummal immunizálunk,
- iii) egy immunkompetens B-sejtet izolálunk az immunizált donorállatból,
- iv) az említett immunkompetens B-sejtet egy folytonos sejtosztódásra képes tumor-sejtvonal fuzionáljuk,
- v) a keletkező hibridsejteket elkülönítjük, alkalmas tápközegben tenyésztjük, majd a pozitív hibridsejteket klónozzuk, és
- vi) a klónozott hibridómák közül szelektáljuk a metolaklór felismerő monoklonális antitesteket termelő sejteket.

A metolaklór iránt nagy specifitással és affinitással rendelkező monoklonális antitestek – amelyek lényegében semmilyen keresztreaktivitást nem mutatnak a

legismertebb, szerkezetileg rokon metolaklór-analógokkal – előállítása során úgy járunk el, hogy a fentiek szerint előállított hibridóma-sejtvonalakat in vivo vagy in vitro tenyésztjük, és a termelt monoklonális antitesteket elkülönítjük.

A kapott monoklonális antitestet azután valamely ismert immunvizsgálatban alkalmazzuk metolaklór immunológiai kimutatására.

- 5 Ez az immunológiai kimutatási eljárás alkalmazható például talaj-, víz- vagy levegőminták, valamint biológiai anyagok, így például növényi vagy állati kivonatok metolaklór-tartalmának kimutatására a találmány szerint előállított monoklonális antitestek alkalmazásával.

- 10 Különösen előnyös ezzel összefüggésben egy kompetitív ELISA, amely mint közvetlen vagy közvetett immunvizsgálat kerül alkalmazásra.

- 15 Ugyancsak a találmány körébe tartozik a metolaklór minőségi és mennyiségi meghatározására szolgáló teszt-kit is, felhasználásra kész formában, amely legalább egy, a találmány szerint előállított antitestet tartalmaz reagensként, és szabadföldi alkalmazásnál a metolaklór gyors és megbízható kimutatására alkalmas.

- 20 A találmány szerinti monoklonális antitestek előállítása olyan önmagában ismert eljárások segítségével történik, amelyek lényegében Köhler és Milstein által kifejlesztett módszereken alapszanak (Nature, 256: 495–497, 1977). Mivel az analizálandó metolaklór célanyag esetén, amelynek a számára monoklonális antitesteket kell kifejleszteni, olyan viszonylag kis és egyszerű molekuláról van szó, amely valamely kísérleti állaton való alkalmazás után egymagában nincs abban a helyzetben, hogy ott megfelelő immunreakciót váltson ki, a tulajdonképpeni immunizálás előtt először előkészítő műveleteket kell végezni.

- 25 Olyan vegyületeket, amelyek nagyságuk és egyszerű felépítésük alapján nincsenek abban a helyzetben, hogy immunreakciót indítsanak el, hapténként vagy nem teljes antigénként jelölünk, és ezzel ezeket a teljes antigénnel (= immunogénnel) szembe állítjuk, amelyek egyaránt
- 30 hatnak antigénként és képesek immunreakciót elindítani. Ezek a hapténmolekulák nagy molekulákhoz (vivőmolekulákhoz) konjugálhatók és ezáltal tulajdonságaikban teljes antigénnel összehasonlíthatóvá válnak, azaz megvan most már a képességük immunreakció kiváltásához.

- 35 Néhány, az immunreakció lefolyása során képződött antitest ezután abban a helyzetben van, hogy specifikus epitópokkal a hapténmolekulán reagáljanak, függetlenül attól, hogy a hapténmolekula egymagában van, vagy mint előbb a vivőmolekulához kapcsolódik.

- 40 A következőkben gyakran alkalmazott „haptén” megjelölésen a találmány keretében elsősorban az immunizálásra alkalmazott metolaklór-molekulát kell érteni.

- 45 A találmány keretében ezért a hapténként működő metolaklór a kísérleti állatok immunizálása előtt olyan nagy molekulájú vivőanyaghoz (carrier) kapcsoljuk, amely alkalmas arra, hogy az említett metolaklórnak teljes antigén hatást kölcsönözzön.

- 50 Vivőmolekulákon a találmány keretében elsősorban olyan molekulákat értünk, amelyek szabadon hozzáférhető reakcióképes csoportokat tartalmaznak a haptén-

nel való kapcsolódási reakció számára, és amelyek abban a helyzetben vannak, hogy a hapténhez való kapcsolódás útján, ennek immunogén képességet kölcsönözzenek vagy ennek a már meglévő immunogenitását erősítsék.

Különösen előnyben részesülnek a találmány keretében azok a makromolekulás vegyületek, amelyek szabadon hozzáférhető reakcióképes aminocsoportokat tartalmaznak.

Különösen előnyben részesülnek a találmány szerinti alkalmazásra vivőmolekulákként azok a lizinben gazdag proteinek, amelyeknek a molekulatömege 10 000 és 1 500 000 között van, így például a marha szérumalbumin (BSA: móltömeg 66 200), humán szérumalbumin (HSA: móltömeg 58 000) vagy a Keyhole Limpet hemocianin (KLH: móltömeg 1 000 000), amelyek kereskedelmi forgalomban beszerezhetők és tet-
 15 szés szerinti mennyiségben rendelkezésre állnak.

Magától értetődően a találmány keretében más makromolekulás vegyületek is alkalmazhatók vivőmolekulákként, amennyiben a fent megadott feltételeknek megfelelnek, így például a sertés tiroglobulin, B2 mikroglobulin, hemocianin, immunglobulin, toxin (kolera-, tetanusz-, diftéria-toxin és hasonlók), poliszacharidok, lipopoliszacharidok, természetes vagy szintetikus poli-
 20 adenil- és poliuridilsavak, polialanil- és polilizin-polipeptidek vagy sejtmembrán-komponensek, így például formalinnal vagy glutáraldehiddel kezelt eritrocita-sejtmembránok.

Ugyancsak alkalmas vivőmolekulaként való használatra a találmány szerinti eljárás során a tisztított IgG frakció egér IgG (H+L)-el szemben, amely nyulakból származik, H. Kawamura és J. A. Berzofsky által leírt eljárásnál (J. Immunol., 136: 58 1986).

A haptén konjugálása a vivőmolekulához történet vagy közvetlenül, vagy előnyösen valamely hídtagon keresztül, amelyet adott esetben először a hapténmolekulára viszünk rá.

Az elemzendő anyagnak a vivőmolekulához való kapcsolását emellett úgy kell végezni, hogy a célanyagok releváns szerkezeti elemei szabadon hozzáférhető maradjanak és ezzel olyan helyzetbe kerüljenek, hogy fajlagos immunreakciót váltsanak ki, azaz megindítsák a fajlagos antitestek kötődését.

A hapténnek (metolaklórnak) a vivőmolekulához történő kapcsolása számára hídtagonként elsősorban olyan vegyületek jönnek számításba, amelyek abban a helyzetben vannak, hogy a vivőmolekula szabadon hozzáférhető reakcióképes csoportjaival kölcsönhatásba lépjenek.

Különösen előnyös a találmány keretében olyan hídtagok alkalmazása, amelyek 3 és 10 közötti híd-szénatomot foglalnak magukban és reakcióképes csoportként egy vagy több reaktív csoportok, így például amino-, karboxi- vagy SH-csoportot tartalmaznak. Ezeket a reaktív csoportokat önmagában ismert eljárások segítségével a haptén és a vivőmolekula reakcióképes csoportjaival reakcióba hozzuk haptén-vivőanyag-konjugátum kialakítása közben.

Így például lehetséges egy hídtagot valamely reak-

cióképes aminocsoporton keresztül dialdehidek (például gutár-dialdehyd) segítségével a vivőmolekula szabad csoportjainak egyikéhez kötni.

Abban az esetben, ha a hídtag egy reakcióképes SH-csoportot tartalmaz, akkor a haptén konjugálását a vivőmolekulához oxidáció útján valósítjuk meg a vivőanyag SH-csoportjaival.

Különösen előnyös a találmány keretei között karboxicsoporthal rendelkező hídtagok alkalmazása, amelyek vízmegkötő szerek segítségével, így például karbodiimiddel, előnyösen N,N'-diciklohexil-karbodiimiddel, a vivőmolekula valamely szabad aminocsoportjával kapcsolhatók össze.

Annak érdekében, hogy az antigént vivőproteinhez kapcsoljuk, először ehhez a kapcsoláshoz alkalmas metolaklór-származékot elő kell állítanunk.

Olyan metolaklór-származékok, amelyek a találmány keretében alkalmazhatók, különösen az (I) általános képletnek megfelelő vegyületek, amelyek a metolaklór aminofunkciójához viszonyítva 4-es helyzetben olyan R-(CH₂)_n-O-csoportot tartalmaznak, amelyben R jelentése -COOH, -NH₂ vagy -SH csoport, különösen -COOH csoport, és n értéke 1-10 előnyösen 1-6 közötti egész szám.

Vivőmolekulához való kapcsolásra alkalmas (I) általános képletű metolaklór-származékokat úgy állíthatunk elő, hogy valamely (II) általános képletű vegyületet, amelyben R és n jelentése az (I) általános képletnél megadottakkal egyezik, célszerűen valamely a reakcióval szemben közömbös oldószerben, előnyösen enyhe reakciókörülmények között (-10 °C és 30 °C közötti hőmérsékleten) N-acilezéshez alkalmas klórecetsav-származékokkal N-acilezzünk.

N-acilező szerként reakcióképes klórecetsav-származékok, különösen savhalogenidek (például klór-ecetsav-klorid vagy -bromid), -észterek és -anhidridek jönnek számításba. Ennél a reakciónál előnyös, ha a felszabaduló savat alkalmas savmegkötő szerrel megkötjük. Ehhez alkalmasak például a szerves bázisok, így a trialkil-aminok (trimetil-amin, trietil-amin és mások), piridin- és pirimidinbázisok, vagy a szervetlen bázisok, így az alkálifémek és alkáliföldfémek oxidjai, hidroxidjai (például az NaOH vagy a KOH), hidrogén-karbonátjai, karbonátjai vagy a hibridjei. Az átalakítást célszerűen 2 egyenértéknyi kötőanyag jelenlétében visszük végbe az (I) általános képletű termékre vonatkoztatva. Katalizátorként 4-dialkil-amino-piridint alkalmazhatunk.

A (II) általános képletű vegyületek előállítására a későbbiekben az N-klóracetil-N-(1-metil-2-metoxi-
 50 etil)-2-metil-4-(4'-hidroxikarbonilbutoxi)-6-etil-anilin, előállítására vázlatosan megadott módon történik.

Valamely megfelelő metolaklór-származéknak egy vivőmolekulához való kapcsolására előnyös példa az N-klóracetil-N-(1-metil-2-metoxi-etil)-2-metil-4-(4'-hidroxikarbonilbutoxi)-6-etil-anilin, amelyet - ahogy az ezután következőkben leírjuk - egy 6-lépéses eljárással állíthatunk elő 3-etil-4-nitrozó-5-metil-fenolból kiindulva. A kiindulási fenol ismert vagy szerkezetileg hasonló ismert fenolokhoz hasonlóan állítható elő.

A keletkező kapcsolásra képes metolaklór-száрма-

zék új vegyület és ez a fajlagos kapcsolóképesége alkalmassá teszi értékes kiindulási anyagként való felhasználásra metolaklór-fajlagossággal rendelkező monoklonális antitestek előállításánál.

A tulajdonképpeni reakció kivitelezését előnyösen az aktív észter-módszer segítségével végezzük. Ennek során a metolaklór-származékot először valamely alkalmas oldószerben szolubilizáljuk. Alkalmas oldószerekként különösen olyan protonmentes oldószerek jönnek számításba, amelyeknek csekély a párolgási sebessége. Ilyenek például a N,N-dietil-formamid (DMF) vagy a dimetil-szulfoxid (DMSO).

Ezt követően a karboxicsoportokat aktív észterre alakítjuk, miközben az előzőleg szolubilizált metolaklór-származékot, például N-hidroxi-szukcinimiddel, N-hidroxi-szulfó-szukcinimiddel vagy N,N'-karbonil-diimidazolal vagy e vegyületek származékaival reagáltatjuk.

Az aktív észtert azután a reakcióelegyből kiválasztjuk és BSA-hoz vagy KLH-hoz adjuk. Az elegyet 0,1–12 óra hosszat, előnyösen 3–5 órán át, inkubáljuk és a kivált csapadékot eltávolítjuk. A felülúszó részt ezután adott esetben további tisztítólépések közebeiktatása után a tulajdonképpeni immunizációs reakció számára alkalmazhatjuk.

A találmányunk szerinti eljárás keretében előnyös aktív észter-módszer mellett alternatív eljárások is alkalmazhatók a hapténnek a vivőmolekulához való kapcsolására, ilyen például a vegyes anhidridmódszer. Ennél a hídtag karboxicsoportját ecetsavanhidrid alkalmazása közben, vagy az 1-etil-3-(3'-dimetil-amino-propil)-karbodiimid karbodiimid-származék karboxicsoportját kapcsoljuk a vivőmolekulához.

A donorállatok immunizálását egy nagy molekulájú vivőmolekulához kapcsolt haptén egyszer vagy többszöri alkalmazása útján végezzük. Különösen előnyös 2-3-szori alkalmazás, amely 7–30 napi, különösen 12–16 napi, időközökben történik.

A találmány keretében előnyös alkalmazási forma az injekció, amelyet mind intravénásan és intraperitoneálisan, mind szubkután alkalmazhatunk. Előnyös a szubkután és intraperitoneális injekció kombinációja.

Az antigén (metolaklór-konjugátum) ebben az esetben alkalmas pufferben, így például PBS-pufferben, van jelen, amely a szokásosan alkalmazott segédanyagok egyikét tartalmazza. Különösen előnyös a találmány keretében a Freund-féle segédanyag használata.

Egy 0,5–4 hónapos nyugalmi időszak után történik a hapténkonjugátum további egyszeri alkalmazása 100 µg-tól 1000 µg-ig terjedő adagban.

Az utolsó adagolást követő 1–6 hónapos időtartam alatt a donorállatokat leöljük és egy lépsejtszuspenziót állítunk elő.

Az elkülönített lépsejteket alkalmas pufferben (például BSS-pufferben) szuszpendáljuk és addig tároljuk sejtszuspenzió formájában, ameddig megfelelő myeloma-sejtekkel nem fuzionál.

Kezdetben ezt a fúziót az bonyolította, hogy a myeloma-sejtvonalak is szintetizáltak monoklonális antitesteket, így a hibrid két típusú monoklonális antitestet termelt, amelyek közül az egyik eredete a myeloma-

sejt, a másik pedig az, amelyet az immunkompetens sejt genetikai információja határozott meg.

A találmány keretében ennél fogva előnyösen olyan tumorsejteket alkalmazunk, amelyek maguk nem tudnak monoklonális antitesteket létrehozni, így például SP2/0-Ag14-et (Shulman és munkatársai: Nature, 276, 269–270, 1978) vagy X63-Ag8.653-at, ami által a keletkező fúzióstermékek elemzése nagyon nagy mértékben leegyszerűsödik. A fúzió sikere szempontjából előnyös, ha a lépsejtek 2-20 szoros feleslegben vannak jelen a myeloma-sejtekhez viszonyítva.

A lép- és myeloma-sejtek fúzióját valamely fúziós közegben végezzük, amelynek olyan az összetétele, amely az előirányzott sejtfúzió optimális feltételeit biztosítja.

Az említett fúziót közeg esetében előnyösen olyan pufferoldatról van szó, amely a sejtek fúziója számára szokásosan alkalmazott fúziós promotorok egyikét tartalmazza, így például Sendai-vírusok vagy más paramyxovírusok, adott esetben UV-inaktív formában, kalciumionok, felületaktív lipidek, így például lizolecitin vagy polietilén-glikol jönnek számításba. Különösen előnyös a találmány keretében polietilén-glikol (PEG) alkalmazása, különösen pedig 600–6000 átlagos molekulatömegű polietilén-glikol (PEG) használata 30–60% koncentrációban. Különösen előnyös egy 40–50%-os PEG-koncentráció. Az optimális fúziós hőmérséklet 18 °C és 39 °C között van. Különösen előnyös a 37 °C-os hőmérséklet.

Az immunkompetens lépsejteknek a myeloma-sejtekkel való fúziójának a megtörténte után a fuzionált antitest-termelő hibridsejteket önmagában ismert eljárás segítségével szelektáljuk.

Sikeres fúziós események (hibridsejtek) kiválasztására a 2 szülősejt típusból különböző lehetőségek vannak. Rutinszerűen egymillió vagy több sejtet alkalmazunk mindegyik szülőtípusból a fúziós eljárásban. Mivel a fúzió nem megy végbe 100%-os gyakorisággal, nehéz vállalkozássá válhat a fúziós termékek elválasztása a nem fuzionált vagy önmagukkal fuzionált szülősejtek nagy többségétől.

Ahogy már előbb említettük, a hibridómasejtek rövid életű antitesteket termelő (lép) B-sejtek, valamint hosszú életű myeloma-sejtek fúziója útján keletkeznek.

A kívánt eredmény egy hosszú életű sejtvonal, amely antitesteket termel. Mivel a lépsejtek csak korlátozott ideig élnek a tenyészetben, ezért egyszerűen kivárhatjuk azt, hogy valamennyi nem-fuzionált, valamint minden önmagával fuzionált lépsejt elhal. Ezután még mindig fennáll az a feladat, hogy a hosszú életű antitest-termelő sejteket elválasszuk a hosszú életű nem-antitest-termelő sejtektől.

Egy járható szelekciós módszer azon alapszik, hogy rendelkezésre áll-e a hipoxantin-guanon-foszforibozil-transzferáz (HGPRT) enzim. Ez az enzim alkotó része a purin „salvage pathway”-nek az emlősök sejtjeiben. Ezek a sejtek ezenfelül abban a helyzetben is vannak, hogy a purint újból (de novo) szintetizálják.

Normális körülmények között valószínűleg mindkét szintézisút egy bizonyos fokig párhuzamosan működik.

Abban az esetben mégis, ha egy sejt nem rendelkezik HGPRT-vel, akkor a „salvage pathway” megakad és a purint nem-purin anyagból kell előállítani.

HGPRT-negatív myeloma-sejtek kiválasztására rendszerint úgynevezett purin-antimetabolitokat alkalmazunk, így például a 8-azaguanint, amely szerkezetileg nagyon hasonló a purin-guaninhoz és ez ennél fogva normál reakciójának egynémelyikében azt pótolhatja.

Az azaguanin beépül a DNS-be, amely a normális növekedés befolyásolásához és végül a sejt elhalásához vezet. Mivel az azaguanint a „salvage pathway” útján kell pótolni, mindazok a sejtek, amelyek nem rendelkeznek HGPRT-aktivitással, azaguanint nem értékesítenek és ennél fogva ennek jelenlétében növekszenek.

Olyan szelektív rendszert, amely ugyanezzel az enzimmal de ellenkező előjellel működik, tehát ez esetben HGPRT pozitív sejtek válnak ki, J. W. Littlefield írt le 1964-ben (*Science*, 145, 709).

Ez a kiválasztó (szelekciós) rendszer az úgynevezett HAT-közeg alkalmazásán alapszik, amely többek között hipoxantint, aminopterint és timidint (HAT-közeg) tartalmaz alkotóanyagokként. Az aminopterint egy aminometabolit, amely a de novo purin-szintézist, valamint a dezoxiuridilát timidilattá való metilezését gátolja.

A hipoxantin segédpurinként működhet arra az esetre, ha az aminopterint a de novo purin-szintézist blokkolja, mialatt a timidin a dezoxiuridilát metilezésének a szükségességét feleslegessé teszi.

Ennél fogva aminopterint jelenlétében valamennyi HGPRT pozitív sejt szaporodik, miközben a HGPRT negatív sejtek elhalnak.

Abban a hibridrendszerben, amelyet e találmány keretében a kiválasztásra (szelekcióra) alkalmazunk, a myeloma-sejtek előnyösen rezisztensek azoguaninnal szemben és érzékenyek aminopterinnel, azaz HGPRT-negatívak. Az antitesteket termelő sejtek ezzel szemben HGPRT-pozitívak.

A sejtek fúziója és egy HAT-közegben való tenyésztése útján az egymással sikeresen fuzionált sejtek szelektálhatók, mivel a myeloma-sejtek, amelyek a szaporodásért felelősek, csak bizonyos HGPRT-aktivitás jelenlétében fejlődhetnek és ezt az aktivitást a HGPRT-pozitív sejtvonalnak kell szolgáltatnia.

A HGPRT-pozitív antitesteket termelő sejtvonalak ebben a közegben nem pusztulnak ugyan el, de csak bizonyos ideig élnek és nincsenek abban a helyzetben, hogy szaporodjanak.

Ezáltal a sejtek fúziója útján a HAT-közegben olyan rendszert létesítünk, amelyben jóllehet a myeloma-sejteket és az antitesteket termelő sejtek bizonyos időtartamig még fejlődnek, és ez a hibridsejtek termelésére elegendő, amely időtartam alatt csak a hibridsejtek maradnak fenn és szaporodhatnak.

A találmány egy előnyös megvalósítási módjában a hibridsejteket kezeletlen, nem-immunizált kísérleti állatok hashártyájából előzőleg izolált magrofágok (nagy falósejtek), úgynevezett „feeder-sejtek”, jelenlétében tenyésztjük. A fuzionált hibridsejtek tenyésztésére és szelekciójára a sejtszuspenziót több egyenlő részre osztjuk és az egyes egyenlő mennyiségeket állandóan

vizsgáljuk arra vonatkozóan, hogy kifejlődtek-e a hibridsejtenyészetek és képződnek-e antitestek.

Különösen előnyös a találmány keretében a fuzionált hibridsejteknek mikrotiterlapokon történő tenyésztése.

5 Ennek során a fúzió után kapott sejtszuspenziót valamely mikrotiterlap egyes mélyedéseibe szétosztjuk és 7–30 napos időtartam alatt alkalmas – a fuzionált hibridsejtek növekedését elősegítő – körülmények között (például HAT/HT-közegekben) tenyésztjük.

10 A mosott hibridtenyészet felülúszó részét folyamatosan vizsgáljuk az antitestek képződésének a megállapítása érdekében.

A pozitív sejtenyészeteket ezután ismert eljárások segítségével, előnyösen limitáló hígítási eljárás segítségével egyes tagokra szétválasztjuk és megfelelő tenyészközegekben klónozzuk.

A mosott sejtklónok felülúszó részét ugyancsak ellenőrizzük az antitestek képződésének a megállapítása érdekében.

20 Az előző leírás szerint előállított találmány szerinti hibridóma-sejtklónok szűrővizsgálatát annak érdekében, hogy megállapítsuk alkalmas monoklonális antitestek képződését, előnyösen valamely erre a célra szokásosan alkalmazott immunvizsgálat segítségével, így például egy enzimkapcsolásos immunvizsgálattal vagy egy radio-immunvizsgálattal állapítjuk meg.

Az enzimmal kapcsolt immunvizsgálatnál az előzőekben közelebbről jellemzett haptén-konjugátumot először egy szilárd vivőanyagra adszorbeáljuk. A szabadon maradó szabad kötési helyeket ezt követően vivőanyag-molekulák hozzáadása útján feltöltjük és ily módon blokkoljuk.

Monoklonális antitestek bizonyításához az említett hibridóma-sejtklónok felülúszó részeinek egyenlő 35 mennyiségeit vivőanyaghoz kötött haptén-konjugátumokkal együtt inkubáljuk.

A találmány további tárgya monoklonális antitestek előállítására önmagában ismert eljárások alkalmazása közben, amelyre az jellemző, hogy az előzőekben közelebbről jellemzett hibridóma-sejtvonalakat vagy azok klónjait vagy szubklónjait, amelyek a találmány szerinti antitesteket szintetizálják és a környező közegbe leválasztják, in vitro vagy in vivo ismert eljárások segítségével tenyésztjük.

45 A találmány szerinti hibridóma-sejtek in vitro tenyésztését alkalmas tápközegben, különösen a szokásosan alkalmazott, szabványos tápközegekben, így például Dulbecco's Modified Eagle Mediumban (DMEM) vagy RPMI 1640 közegben, amelyet adott esetben emulós-szérumokkal, így például magzati borjúsérummal, vagy növekedést fokozó adalékokkal és nyomelemekkel kiegészíthetünk.

A monoklonális antitestek elkülönítését előnyösen az immunglobulin-frakciónak a hibridóma-tenyészetek 55 mindenkor felülúszó anyagaiból való kikapcsolással kezdjük, például a kicsapást ammónium-szulfát segítségével végezzük. Ehhez kapcsolódnak olyan további feldolgozó és tisztító lépések, amelyek a szakterületen járatos szakember által ismertek, így például a gélszűrés, az ioncserés kromatográfia, a DEAE-

cellulóz-kromatográfia, a Protein A vagy immunaffinitás-kromatográfia.

A találmány szerinti monoklonális antitestek nagy mennyiségét azonban *in vivo* eljárások segítségével is kaphatjuk.

Így például lehetőség van arra, hogy olyan antitest-termelő hibridóma-sejtklonokat fecskendezzünk alkalmas emlősállatokba, amelyek megindítják az antitest-termelő tumorok fejlődését a kezelt állatokban. Mintegy 1-3 hét elteltével az antitesteket kiválaszthatjuk az ily módon kezelt állatok testfolyadékaiból.

A találmány egy különleges kiviteli formájában nőstény Balb/c egereket, amelyeket adott esetben valamely szénhidrogénnel, így például prisztánnal előkezelünk, valamely találmány szerinti hibridóma-sejtklonnal intraperitoneálisan beoltunk. A hibridóma-sejtklonok beoltása után 1-4 héttel a hasvízkórfolyadékot (ascites-folyadékot) összegyűjtjük és további feldolgozásig megőrizzük.

A monoklonális antitestek elkülönítését hasonló módon végezzük, ahogy az előzőekben leírt elkülönítést végeztük az *in vitro* körülmények között tenyésztett hibridómák felülúszó részéből.

A találmány egy további tárgya a találmány szerinti antitestek alkalmazása a szokásos immunvizsgálatok valamelyikében a metolaklór kimutatására, valamint a metolaklór megkülönböztetésére a szerkezetileg rokon vegyületektől, különösen pedig az alaklór metolaklór-analógtól, a talaj-, levegő- és vízmintákban, valamint adott esetben növényekből vagy más biológiai anyagból származó kivonatokban.

A találmány szerinti monoklonális antitestek így minden olyan ismert immunvizsgálatban alkalmazhatók, amelyek antigének és a megfelelő monoklonális antitest közötti specifikus kötésen alapszanak és épülnek fel, így például valamely radio-immunvizsgálatban (RIA), enzimkapcsolásos immunvizsgálatban (ELISA) és immunfluoreszcencia-tesztben, valamint hasonló vizsgálatoknál.

A RIA-tesztnél a találmány szerinti monoklonális antitesteket mint ilyeneket, vagy radioaktívan jelzett származék formájában alkalmazhatjuk. Emellett valamennyi, máig ismert RIA-tesztmódosítást alkalmazhatjuk e találmány keretében fontos célszám kimutatására, így például RIA-tesztet használhatunk homogén vagy szilárd fázisban, heterogén RIA-tesztet, valamint egyszerű vagy dupla („sandwich”) RIA-tesztet az antigén közvetlen vagy közvetett (kompetitív) kimutatásával együtt. Hasonló érvényes valamely enzimkapcsolásos immunvizsgálat alkalmazására is.

Előnyös a találmány keretében valamely találmány szerinti monoklonális antitest alkalmazása kompetitív immunvizsgálatban metolaklór kimutatására.

A kompetitív immunvizsgálat elve és lényege egy versenyen alapszik valamely jelzett, illetve valamely szilárd hordozóanyaghoz kötött antigén és egy szabad antigén között az antitestmolekulán lévő fontos kötési helyekért.

Alapjában véve két lehetőséget különböztetünk meg ennek a kompetitív immunvizsgálatnak a végrehajtására.

a) Az első eljárás azon a versengésen alapszik, amely valamely szilárd hordozóanyaghoz kötött antigén és a szabad antigén között fennáll az antitesten lévő szabad kötési helyekért, ahol az antitest jelzéssel van ellátva. Az antigén kötődése valamely szilárd hordozóanyaghoz közvetlenül vagy egy vivőanyag-molekulán keresztül történik.

A szabad antigénre vonatkozó koncentráció meghatározása ebben az esetben a jelzéssel ellátott, a hordozóanyaghoz rögzített kötött antitest levétele útján történik.

Ez a levétel arányos a próbában lévő szabad antigén mennyiségével.

b) Egy más eljárás azon alapszik, hogy a szabad és jelölt antigén versenyeznek egymással az antitest fontos kötési helyeiért. Ebben az esetben az antitest egy szilárd hordozóanyaghoz van kötve.

A szabad antigénre vonatkozó koncentráció meghatározása a jelölt antigén levétele útján történik, amely változik a szabad antigén koncentrációjának a függvényében.

Olyan szilárd hordozóanyagként, amely alkalmas az antigén vagy az antitest megkötésére, például egy mikrotiterlap vagy egy próbacső felülete, polisztirolból, polipropilénből, polivinil-kloridból, üvegből vagy műanyagból készült golyók felülete, vagy szűrőpapír-, dextrán-cellulóz- vagy nitrocellulóz-szalagok felülete vagy hasonló anyagok jönnek számításba. Ezeket bevonjuk a találmány szerinti monoklonális antitestek egyikével vagy valamely antigénnel, mimellett a kötés a hordozóanyaghoz egyszerű adszorpcióval, vagy adott esetben a hordozóanyagnak például glutaraldehiddel vagy cianogénbromiddal való előzetes aktiválása után való közvetítés útján történhet.

Különösen előnyös a találmány keretében a találmány szerinti monoklonális antitestnek valamely enzimkapcsolásos immunvizsgálatban való alkalmazása [ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)]. Ennek során a találmány szerinti antitestet mint olyat, vagy valamely enzimmel kapcsolt származék formájában használhatjuk.

Az ELISA-vizsgálat a találmány szerinti antitest valamely enzimmel kapcsolt származékának az alkalmazásán vagy önmagában ismert enzimmel kapcsolt antitestek használatán alapszik, amelyek egy találmány szerinti antitest valamely epitópját felismerik és ahhoz kötődnek.

A találmány keretében különösen előnyös valamely közvetett ELISA-vizsgálat alkalmazása, amelynél az előzőekben leírt hordozóanyagot először egy antigénnel, különösen hapténnel és egy nagy molekulájú vivőanyagból, például BSA-ból vagy KLH-ből álló konjugátummal bevonjuk. Előnyös a találmány keretében 10 ng/100 µl puffer–200 ng/100 µl puffer, előnyösen 30 ng/100 µl puffer–100 ng/100 µl puffer, különösen pedig 40 ng/100 µl puffer–60 ng/100 µl puffer nagyságú konjugátumkoncentráció használata.

A hordozóanyaghoz kötött antigént ezt követően olyan tesztoldattal együtt inkubáljuk, amely a kimutatandó antigént, valamint a találmány szerinti antitest egyikét tartalmazza. A kimutatandó antigén ez esetben

szabad formában vagy víz- vagy talajminta alkotórészeként lehet jelen.

Az összes anyagot 10 perc és 2 óra közötti inkubálás után enzimmal jelölt antitesttel együtt inkubáljuk, amely a találmány szerinti monoklonális antitestet felismeri és ehhez hozzákapcsolódik. Egy ilyen enzimmal jelölt antitest példája egy foszfatázsal jelölt kecske anti-juh immunoglobulin, vagy egy megfelelő kecske antieger antitest, amelyek kereskedelmi úton beszerezhetők.

A kötött antitestprotein mennyiségét egy enzimszubsztrátum-reakció útján, például spektroszkópiás eljárás segítségével meghatározhatjuk.

Ugyancsak előnyös a találmány keretében olyan közvetlen ELISA-teszt, amely jelölt, illetve szabad antigénnek az előzőekben megnevezett hordozóanyagok egyikéhez kötött antitestért való versengésen alapszik.

Az antigén megjelölését ismert eljárások segítségével végezhetjük az immunológiai diagnosztikában szokásosan alkalmazott jelölőanyag felhasználásával.

Előnyös a találmány során valamely enzim-jelölőanyag használata, amellyel a kimutatandó antigént összekötjük. Ilyen anyag például az alkalikus foszfatáz.

A szabad antigén részarányát, amely egy bizonyos mintában jelen van, ezután nagyon egyszerűen meghatározhatjuk a jelölt antigén csökkenése alapján, amely annál nagyobb, minél több szabad antigén van a próbában.

A találmány kiterjed továbbá metolaklór minőségi és mennyiségi meghatározására teszt-kitek formájában, amelyek a találmány szerinti monoklonális antitestek és/vagy származékaik mellett, adott esetben még más monoklonális vagy poliklonális antitesteket, különösen jelölt monoklonális vagy poliklonális antitesteket, valamint további adalékanyagokat is tartalmazhatnak.

Különösen előnyösek a találmány keretében azok a teszt-kitek, amelyek a szokásosan alkalmazott immunvizsgálatok egyikén alapszanak, és amelyek a radioimmunvizsgálat, enzimakcsolásos immunvizsgálat és a kemilumineszcencia-vizsgálat csoportból kerülnek ki. Elsősorban előnyösek azok a teszt-kitek, amelyeknél a metolaklór kimutatása valamely kompetitív immunvizsgálaton (ELISA) alapszanak.

Metolaklór radioimmunológiai kimutatására szolgáló teszt-kitek például a következő alkotóanyagokból állnak:

- a) egy alkalmas vivőanyag, amely bevonatlan vagy a találmány szerinti antitestek egyikével vagy valamely antigénkonjugátummal lehet bevonva;
- b) a találmány szerinti antitestek egyikének és/vagy ilyen antitestek radioaktív módon jelölt származékának vagy egy radioaktív módon jelölt adott, esetben fagyasztva szárított vagy tömény oldatait vagy az antigén szabványos oldatait;
- c) pufferoldatok, és
- d) adott esetben polipeptidok, detergensok és további adalékanyagok, amelyek például nem-specifikus adszorpciót és aggregátumképződést akadályoznak, valamint
- e) pipetták, reakcióedények, kalibrációs görbék, jelzőcédulák és hasonlók.

Azok a teszt-kitek a metolaklór immunológiai ki-

mutatására, amelyek enzimakcsolásos immunvizsgálaton (ELISA) alapszanak, például a következő alkotóanyagokat tartalmazhatják:

- 5 a) valamely alkalmas vivőanyag, amely bevonatlan vagy a találmány szerinti antitestek egyikével vagy egy antigénkonjugátummal lehet bevonva;
 - 10 b) a találmány szerinti antitestek egyikének és/vagy egy második enzimmal jelölt monoklonális vagy poliklonális antitestnek, amely a meghatározandó antigén vagy egy az antigént felismerő antitest ellen irányul, adott esetben fagyasztva szárított vagy tömény oldatait;
 - c) enzimkivonatok szilárd vagy oldott formában;
 - e) az antigén vagy az antigén szabványos oldatait;
 - 15 f) pufferoldatok;
 - g) adott esetben polipeptidok, detergensok és további adalékok, amelyek például nem-specifikus adszorpciót és aggregátumképződést akadályoznak, valamint
 - 20 h) pipetták, reakcióedények, kalibrációs görbék, színtáblák, jelzőcédulák és hasonlók.
- Egy olyan teszt-kit, amely metolaklór kimutatására szolgál, és amely kemilumineszcencia-teszten alapszik, például a következő alkotóanyagokat tartalmazhatja:
- 25 a) valamely alkalmas vivőanyag, amely bevonatlan vagy a találmány szerinti antitestek egyikével vagy egy antigénkonjugátummal lehet bevonva;
 - b) a találmány szerinti antitestek egyikének vagy egy második poliklonális antitestnek, amely abban a helyzetben van, hogy a találmány szerinti első antitestet felismerje és amely egy kemilumineszkáló jelölőanyaggal összekapcsolódik, adott esetben fagyasztva szárított vagy tömény oldatait;
 - c) olyan komponens tartalmazó oldatok, amely fénykibocsátást vált ki, így például H_2O_2 és $NaOH$;
 - 35 d) pufferoldatok;
 - e) adott esetben polipeptidok, detergensok és további adalékanyagok, amelyek nem-specifikus adszorpciót és aggregátumképződést akadályoznak, valamint
 - 40 f) pipetták, reakcióedények, jelzőcédulák és hasonlók.

Azok a vivőanyagok vagy hordozóanyagok, amelyek a találmány keretében alkalmazásra kerülnek, elsősorban oldhatatlan polimer anyagok és polisztirol, polietilén, polipropilén, poliészterek, poli(akril-nitril), poli(vinil-klorid), poli(akril-amid), nitrocellulóz, térhálóított dextrán, fluorozott gyanták, agaróz, térhálóított agaróz, poliszacharidok és hasonló anyagok csoportjából kerülnek ki. Emellett azonban más anyagok is használhatók, így például üveg, fém, nylon alapú szövetháló és mások.

Az előzőekben részletesen megnevezett hordozóanyagok nagyon különböző módon lehetnek kialakítva és a mindenkor elérendő specifikus alkalmazási cél függvényében nagyon különböző formájúak lehetnek. Ezek például tálak, golyók, lapok, pálcikák, sejtek, üvegcsék, csövecskék, szálak, hálók és hasonlók lehetnek.

Teszt-kitek előállításánál gyakran kerülnek alkalmazásra például mikrotiterlapok, amelyek átlátszó képlekeny műanyagokból, így például poli(vinil-klorid)-ból vagy polisztirolból készülnek, amelyek bevonatlanok vagy inkább be vannak vonva valamely találmány

szerinti antitesttel, szabad antigénnel vagy valamely antigén-konjugátummal. Ugyancsak felhasználásra kerülnek olyan golyócskák, csövecskék vagy pálcikák, amelyek polisztirolból készülnek, valamint polisztirol-latex, mellette a rávitt latexanyagot centrifugálással elválaszthatjuk a polisztirol-részecskéktől.

A találmány szerinti teszt-kitek egy további alkotóanyagát szolgáltatják a jelölőanyagok vagy indikátorok, amelyeknek a segítségével lehetővé válik valamely komplexképző reakció, különösen egy immunreakció kimutatása, amely előnyösen antigén-antitest-komplexhez vagy egy ligand-receptor-komplexhez vezet, mellette minőségi kimutatás mellett adott esetben mennyiségi adatok is megállapíthatók a kimutatandó antigénre vonatkozóan. Jelölőanyagokként vagy indikátorokként mind egyes atomok, mind pedig molekulák számításba jönnek, amelyek közvetlenül vagy inkább közvetve egy kimutatható jel létesítésében részt vehetnének. Ezek a jelölőanyagok vagy indikátorok vagy közvetlenül a kimutatandó antigénnel vagy a találmány szerinti monoklonális antitestek egyikével össze lehetnek kapcsolva, vagy inkább ezekbe be lehetnek építve. Ezek azonban egyedi anyagokként vagy olyan elkülönített vegyület alkotórészeként léteznek, amely sem a kimutatandó antigén maga, sem a találmány szerinti monoklonális antitestek egyike, amely a maga részéről abban a helyzetben van, hogy a receptormolekulával reagáljon, például komplexképzés formájában.

Ezeknél a különállóan előforduló vegyületeknél előnyösen egy második antitestmolekuláról van szó, amely mind monoklonális, mind poliklonális eredetű lehet, így ennek a kiegészítő proteinje vagy fragmense, például az *S. aureus* protein A és hasonló. Ezek a különálló vegyületek felismerik a receptormolekulát és specifikusan kötődnek hozzá, így például a kimutatandó antigénhez vagy a találmány szerinti monoklonális antitestek egyikéhez, előnyösen pedig olyan receptor-molekulához, amely komplex formában létezik.

Sok esetben további, kiegészítő reagensek szükségesek, amelyek csak a jelölőanyaggal együttműködve vezetnek egy kimutatható jelhez. Ez különösen akkor érvényes, ha enzimek vannak benne.

Azok a jelölőanyagok vagy indikátorok, amelyek a találmány keretében alkalmazásra kerülnek, az immunológia és az immunkémia területén járatos szakember számára nagyon jól ismertek. Ezek közé az anyagok közé tartoznak például radioaktívan jelölt elemek vagy anyagok, enzimek vagy kemilumineszkáló anyagok. A következőkben felsorolásra kerülő lehetséges jelölőanyagok vagy indikátorok csupán arra szolgálnak, hogy az alkalmazható anyagok és reagensek nagy számát és sokféleségét példaképpen bemutassuk anélkül, hogy a találmány körét bármilyen módon ezekre korlátoznánk.

Alkalmas jelölőanyagok vagy indikátorok például a radioaktív elemek csoportján belül található. Emellett különösen olyan elemek előnyösek, amelyek vagy maguk bocsátanak ki γ sugarakat, így például ^{124}J , ^{125}J , ^{128}J , ^{51}Cr elemek, vagy e sugárzások kibocsátását gerjesztik (indukálják), így például ^{11}C , ^{18}F és ^{13}N elemek. Ugyancsak alkalmasak úgynevezett β -sugárzók is, így a ^{11}In , ^{14}C és ^3H elemek.

További alkalmas jelölőanyagok a kemilumineszkáló anyagok, különösen azok a fluoreszkáló anyagok, amelyek nagyon egyszerűen kémiai úton össze lehetnek kötve az antigénnel vagy egy antitesttel anélkül, hogy azt denaturálnák. A keletkező fluorokrom nagyon könnyen kimutatható fluoreszkáló eljárások segítségével. E helyen azokat a fluorokromokat nevezzük meg, amelyek a fluoreszcein-izocianát, fluoreszcein-izotiocianát, 5-dimetil-amino-1-naftalin, szulfonilklorid, tetrametil-rodamin-izotiocianát, lisszamin, rodamin 8200, szulfonilklorid és hasonló csoportjából kerülnek ki.

További fluoreszkáló anyagokat és még analitikai módszereket ír le DeLuca az „Immunofluorescence Analysis”, Antibody As a Tool, Marchalonis et al, John Wiley & Sons, Ltd., pp 189–231 (1982) irodalmi helyen. Különösen előnyös, ha a találmány keretében enzimeket alkalmazunk jelölő vagy indikátoranyagokként, így például tormaperoxidázt, alkalikus foszfátázt, β -D-galaktozidázt, glukóz-oxidázt, glukozamilázt, karbonsavanhidrázt, acetil-kolinészterázt, lizozimot, malátadehidrogenázt, glukóz-6-foszfát-dehidrogenázt, valamint hasonló anyagokat. Enzimeknek jelölőanyagokként való alkalmazásánál szükséges más reagenseknek a hozzáadása is, amelyek lehetővé teszik, hogy kövessük az immunkomplex képződését enzimaktivitás útján, de szükséges adott esetben stop-reagens adagolása is, amelynek a segítségével befejezhetjük az enzimreakciót.

Különösen előnyösek emellett azok a reagensek, amelyek színreakcióhoz vezetnek. A tormaperoxidáz esetében e helyen megemlíthjük példaképpen a hidrogénperoxidot, amely további, oxidáló színezékrekurzorral, így például diamino-benzidinnel vagy o-fenilén-diaminnal kombinációban barna-, illetve sárga-elszíneződéshez vezet. Glukózoxidáz alkalmazásánál jelölőanyagként például 2,2'-azino-di(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonsav) (ABTS) használata előnyös ilyen célra.

A találmány egy további tárgya teszt-kitek alkalmazása, amelyek legalább a találmány szerinti monoklonális antitestek egyikét tartalmazó reagensként, metolaktór gyors és hatásos, minőségi és/vagy mennyiségi kimutatására, valamint a metolaktór megkülönböztetésére a legismertebb, szerkezetileg rokon vegyületekkel, különösen az alaklórral szemben, amely a metolaktór analóg vegyülete.

A találmány szerinti eljárást a továbbiakban kiviteli példákban is bemutatjuk. A leírásban, a példákban és az igénypontokban szereplő részek, százalékok és arányok tömegrészeket, tömegszázalékokat és tömegarányokat jelentenek, amennyiben másképpen nem adjuk meg.

1. Nem-korlátozó kiviteli példák

1. példa

Metolaktór-származékok szintézise

1.1: *Vívőanyag-proteinhez való kapcsolásra alkalmas N-klór-acetil-N-(1-metil-2-metoxi-etil)-2-metil-4-(4'-hidroxikarbonil-butoxi)-6-etil-anilin előállítás* [(1) képletben $R = \text{COOH}$, $n = 4$]

1. lépés: 3-etil-4-nitrozo-5-metil-fenol előállítás

102 g (749 mól) 3-etil-5-metil-fenolt beviszünk

600 ml etanolba és erőteljes keverés közben hozzátépettünk 600 ml tömény sósavat, miközben a reakcióedényt hűtéssel szobahőmérsékleten tartjuk. Ezt követően a reakcióelegyet 0 °C-ra hűtjük. Ezen a hőmérsékleten az elegyhez hozzátépettünk 77,5 g (1123,5 mmól) nátrium-nitritet 78 ml ionmentesített vízben oldva. A keletkező elegyet még 2 óra hosszat 5 °C-on tovább keverjük és utána 3 liter jeges vízre öntjük. Eközben a cím szerinti vegyület kikristályosodik, amelyet szűrővel elkülönítünk és jeges vízzel többször mosunk, majd metanolból átkristályosítunk. Kitermelés 88,7 g (az elméleti hozam 71,8%-a). Op. 138 °C (bomlás közben).

2. lépés: 3-etil-4-amino-5-metil-fenol előállítása
88,7 g (537,6 mmól) 1. lépés szerint előállított 3-etil-4-nitrozo-5-metil-fenolt 20–25 °C-on 1 liter tetrahidrofuranban (THF) molekuláris hidrogénnel 5 bar nyomáson katalitikusan hidrogénezünk. Katalizátorként 10 g 5%-os – aktívszénre felvitt – palládiumot (Pd/C) használunk. A hidrogénfelvétel az elméleti mennyiség 77%-a. A katalizátort utána szűrővel eltávolítjuk, a szűrletet bepároljuk és a maradékot metanolból átkristályosítjuk. Kitermelés 51,2 g (az elméleti hozam 63,2%). Op. 167–170 °C.

3. lépés: 2-metil-4-(4'-etoxi-karbonil-butoxi)-6-etil-anilin előállítása
Egy reakcióedénybe beviszünk 500 ml dietil-szulfidot (DMSO) szobahőmérsékleten és erőteljes keverés közben, kis adagokban hozzáadunk 52,1 g (338,6 mmól) 2. lépés szerint előállított 3-etil-4-amino-5-metil-fenolt. Az elegyet 15 °C-ra hűtjük, utána 33,5 g (507,9 mmól) 85%-os vizes kálium-hidroxid-oldatot csepegtetünk hozzá olyan ütemben, hogy a reakcióhőmérséklet ne emelkedjék 20 °C fölé. Ezt követően 70 perc leforgása alatt az elegyhez hozzátépettünk 82,7 ml (507,9 mmól) 5-bróm-valeriánsav-etilésztert, miközben a reakcióhőmérsékletet 25 °C-on tartjuk. Miután homogén oldat képződött, ezt 130 ml 4 mólos sósav és jég elegyére öntjük és alaposan elkeverjük. A vizes tömeget dietil-éterrel mossuk, a vizes fázist után 2 mólos NaOH-oldattal meglúgosítjuk és dietil-éterrel extraháljuk. Az éterfázist előbb vízzel és utána telített konyhasó-oldattal mossuk, nátrium-szulfát felett szárítjuk és betöményítjük. Ily módon 67,5 g viszkózus olajat kapunk, amelyet vákuumdesztillálással tisztítunk. Kitermelés 31,7 g (az elméleti hozam 33,7%-a). Fp. 151–152 °C/10⁻² torr.

4. lépés: N-(1-metil-2-metoxi-etil)-2-metil-4-(4'-etoxi-karbonil-butoxi)-6-etil-anilin előállítása
30,4 g (108,8 mmól) 3. lépés szerint előállított 2-metil-4-(4'-etoxi-karbonil-butoxi)-6-etil-anilint feloldunk 300 ml metanolban és az oldathoz hozzáadunk 0,3 g tömény kénsavat. Ezt követően az oldathoz keverés közben hozzátépettünk 20 g (163,2 mmól) 72%-os metoxi-acetont 100 ml metanolban oldva szobahőmérsékleten, majd katalitikusan hidrogénezük az

elegyet molekuláris hidrogénnel. Katalizátorként 1,5 g 5%-os –aktívszénre felvitt – palládium szolgál. A hidrogénezést 8 óra hosszat 5 bar nyomáson 40–45 °C-on végezzük, amikor is a hidrogénfelvétel az elméleti mennyiség 106%-át teszi ki. A katalizátort szűrővel elkülönítjük, a maradékot dietil-éterben felvesszük, és éterfázist egymást követően mossuk nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, jeges vízzel és telített konyhasó-oldattal, majd nátrium-szulfát felett szárítjuk és betöményítjük. Kitermelés 29 g (az elméleti hozam 75,9%-a), amely viszkózus világosbarna színű olaj.

5. lépés: N-(1-metil-2-metoxi-metil)-2-metil-4-(4'-hidroxikarbonil-butoxi)-6-etil-anilin előállítása [(II) képletben R = COOH, n = 4]
19 g (54 mmól) 4. lépés szerint előállított n-(1-metil-2-metoxi-etil)-2-metil-4-(4'-etoxi-karbonil-butoxi)-6-etil-anilinhoz szobahőmérsékleten hozzáadunk 150 mólos kálium-hidroxid-oldatot. A keletkező emulziót körülbelül 20 óra hosszat keverés közben szobahőmérsékleten végig reagálni hagyjuk. A reakcióelegy pH-ját ezt követően 7-re állítjuk sósavval és kétszer extraháljuk dietil-éterrel. Az éterfázisokat egyesítjük, telített konyhasó-oldattal többször mossuk, nátrium-szulfát felett szárítjuk és utána bepároljuk. Kitermelés 12,9 g (az elméleti hozam 73,9%-a). $n_D^{25} = 1,517$, viszkózus olaj.

6. lépés: N-klór-acetil-N-(1-metil-2-metoxi-etil)-2-metil-4-(4'-hidroxikarbonil-butoxi)-6-etil-anilin előállítása
9,9 g (30,6 mmól) 5. lépés szerint előállított N-(1-metil-2-metoxi-etil)-2-metil-4-(4'-hidroxikarbonil-butoxi)-6-etil-anilint feloldunk 400 ml metilén-kloridban és az oldathoz keverés közben szobahőmérsékleten hozzáadunk 30,6 ml (30,6 mmól) 1 mólos nátrium-hidroxid-oldatot. Ezután 2,7 ml (33,67 mmól) klór-ecetsav-kloridot csepegtetünk keverés közben 20–25 °C-on lassú ütemben az elegyhez, majd az egészet még körülbelül 2 óra hosszat keverjük. Ezt követően az előző körülmények között még 10,2 ml 1 mólos nátrium-hidroxid-oldatot és utána 0,9 ml klór-ecetsav-kloridot adunk az elegyhez és az egészet még körülbelül 12 óra hosszat keverjük szobahőmérsékleten. A keletkező elegyet meglúgosítjuk, dietil-éterrel extraháljuk, az éteres fázist előntjük és a vizes fázis pH-ját 3-ra állítjuk be sósavoldattal. A vizes fázist ismét extraháljuk dietil-éterrel, jeges vízzel és telített konyhasó-oldattal többször mossuk, nátrium-szulfát felett szárítjuk és bepároljuk. Kitermelés 7,2 g (az elméleti hozam 59%-a) viszkózus olaj. $n_D^{25} = 1,515$.

A 6. lépés szerint kapott vegyület szerkezetét tömegspektrometriás eljárással azonosítjuk [Finningan 4500 „direct-exposure probe”-bal (DEP)].

A vívőanyag-proteinhez való kapcsolásra alkalmas N-klór-acetil-N-(1-metil-2-metoxi-etil)-2-metil-4-(4'-hidroxikarbonil-butoxi)-6-etil-anilin vázlatos előállítási menetét az A) reakcióvázlat szemlélteti.

1.2: Metolaktór-protein konjugátum

Az 1. példa szerint előállított metolaktór-származékot marha szérumbalbuminhoz (BSA; Fluka) vagy Keyhole-Limpet hemocianinhoz (KLH; Calbiochem) kapcsoljuk aktivált észter-módszer alkalmazása közben [Kulkarni és munkatársai: Cancer Res., 41, 2700–2706, (1981)].

Részletesen leírva a származék karboxicsoportját N,N-dimetil-formamidban (DMF) (8 mg/200 µl) szobahőmérsékleten szolubilizáljuk és ezt követően és 4 moláris feleslegben α-hidroxi-szukcinimidet (9,1 mg/200 µl DMF), valamint N,N'-diciklohexil-karbodiimidet (16 mg/200 µl DMF) adunk hozzá. A reakcióelegyet először 1 óra hosszat 22 °C-on és ezt követően 18 óra hosszat 4 °C-on keverjük.

A reakciónál keletkezett fehér színű csapadékot 3 percig 12 000 g-n végzett centrifugálással szobahőmérsékleten eltávolítjuk és az aktivált észtert 24 mg BSA-hoz vagy KLH-hoz adjuk, amelyet előtte 5,4 ml foszfáttal pufferolt sóoldattal [PBS-puffer; 0,01 mól nátrium-foszfát és 0,145 mól NaCl, pH 7,0] szolubilizálunk. A (származék/BSA) moláris arány körülbelül 55/1 (8 mg származék/24 mg BSA).

Az elegyet 4 óra hosszat inkubáljuk 4 °C-os hőmérsékleten, a képződött csapadékot 10 perces 2000 g mellett történő centrifugálással 4 °C-on eltávolítjuk és a visszamaradó felülúszó részt, amely a protein-konjugátumot tartalmazza, kiadósan dializáljuk PBS-sel szemben (amely 3 mmól Na₂N₃-at tartalmaz), előtte és utána az immunizáló kísérletekhez alkalmazzuk.

A kapcsolási reakció mértékét SDS-gélelektroforézissel, valamint abszorpciós spektrofotometriával 280 nm-nél meghatározzuk, amely mind a BSA UV csúcsnak, mind a 6. lépés szerint előállított vegyületnek megfelel ($A_{\max} = 274 \text{ nm}$). A moláris arány metolaktór és BSA között körülbelül 23:1.

1.3: Haptén kapcsolása (konjugálása) alkalikus foszfátához

16 µg 1.2 példa szerint előállított N-klór-acetil-n-(1-metil-2-metoxi-etil)-2-metil-4-(4'-hidroxikarbonil-but-oxi)-6-etil-anilin aktív észterét hozzáadjuk 40 µl – borjúbélből származó – alkalikus foszfátához (153 µg/230 U) (Calbiochem, EIA grade). A reakcióelegyet 4 óra hosszat inkubáljuk 4 °C-on és utána PBS-sel szemben, amely 3 mmól Na₂N₃-at tartalmaz, dializáljuk. A konjugátum enzimaktivitását p-nitrofenil-foszfát szubsztrát segítségével meghatározzuk. Az enzim aktivitása a hapténnel való konjugálás után változatlan marad.

2. példa

Immunizálás

Mindenkor 5-5 állatból álló nőstény BALB/c egerrek (Sissel állatfarm, Svájc), amelyek 4-6 hetesek, 3 széria, KLH-val konjugált metolaktór injekciót kapnak intraperitoneálisan, illetve szubkután (50 µg/injekció).

Az első injekció 0,1 ml konjugátumot tartalmaz PBS-ben, amely 1 : 1 arányban 0,2 ml teljes Freund-féle adjuvánssal van elegyítve. 50 µl-t ebből az injekciós oldatból intraperitoneálisan adunk be, a maradék 150 µl-t pedig szubkután.

A második és a harmadik injekciós szériánál, amely 14 nappal, illetve 30 nappal az első beadás után kerül befecskendezésre, a teljes Freund-féle adjuvánst nemteljes helyettesíti.

5 Az utolsó beadás után 1 héttel vérszérumot veszünk a kísérleti állatoktól és a vértitert ELISA-tesztnek a segítségével határozzuk meg, mimellett a mikrotiterlapokat előzőleg BSA-val konjugált hapténnel vontuk be.

10 2 hónapos nyugalmi időszak után következik a KLH-konjugátum egyszeri intraperitoneális beadása 370 µg/200 PBS adagban.

3. példa

Fúziós eljárás

3.1: „Feeder”-sejtek (peritoneális makrofágok) kinyerése

20 Kezeletlen, körülbelül 6–8 hetes Balb/c-egereket egy nappal az előirányzott fúzió előtt leölünk és 70%-os alkoholban bemeztetés útján sterilizáljuk azokat.

25 Ezt követően a szőrmés bőrt és a felső hashámat sterilén felmetsszük anélkül, hogy a hashártyát (peritoneumot) megsértenénk. Egy steril 5 ml-es műanyagfecskendővel és egy steril 18-as injekcióstűvel 4 ml BSS (Ca²⁺ és Mg²⁺ nélkül) és 1 ml levegőt juttatunk a hasüregbe.

30 A has gyenge masszírozása után (miközben a fecskendő és a tű a hasüregben marad) az előzőleg befecskendezett BSS-puffert ismét leszívjuk a hashártyából és egy steril Falcon-csőbe visszük. Ezt a műveletet még kétszer megismételjük. Az így kapott makrofágokat jéggel hűtjük és ezt követően 20-20 ml BSS-el kétszer mossuk.

35 A makrofágokat emellett 10-10 percig 300 g mellett 5 °C-on centrifugáljuk. A pelletet ezután 50 ml HAT-közegben szuszpendáljuk és a sejtszuspenziót 4 Costar-lapon, amelyek összesen 24 mélyedéssel rendelkeznek, elosztjuk (0,5 ml mélyedésenként).

40 Ezt követően az így előkészített makrofágokat 37 °C hőmérsékleten 6% CO₂-koncentrációnál inkubátorban tartjuk.

Fúziós folyamatonként körülbelül 4×10⁶ makrofág szükséges.

3.2. Myeloma-sejtvonal Sp 2/0-Ag 14 tenyésztése

45 Az említett myeloma-sejtvonal Sp 2/0-Ag 14 egy olyan myeloma-sejtvonal, amely maga nem választ ki antitesteket és amelyet M. Shulman és munkatársai: Nature, 276, 269–270, (1978) írtak le. Ezt a myeloma-sejtvonalat az „American Type Culture Collection”-nál Rockville-ben, Maryland szerezhetjük be.

50 Fúzióként 50 ml jól mosott tenyészet szükséges, amely legalább 10 millió sejtet tartalmaz. A myeloma-sejtek tenyésztése előnyösen T 175 Falcon-palackokban történik (Beckton & Dickenson cég).

55 Egy nappal a fúzió előtt a tenyészkezeget (RPMI 1640) friss RPMI 1640 közegre cseréljük ki. A fúzió napján az Sp 2/0-Ag 14 sejteket begyűjtjük, egy steril 50 ml-es műanyagcsőbe visszük és 10 percig 60 300 g mellett és 5 °C hőmérsékleten centrifugáljuk

(MSE centrifuga, Modell Chilspin, UK). A centrifugálás után a felülszót leszívjuk és elöntjük. A sejteket 30-30 BBS-pufferrel (amely mentes Ca^{2+} és Mg^{2+} ionoktól) kétszer mossuk (10 perc; 300 g mellett; 5 °C) és utána 5 ml BSS-ben szuszpendáljuk azokat.

A sejtszuspenzióból egyenlő mennyiségeket veszünk ki a sejtszám meghatározásához és fluoreszcindiacetáttal (FDA) megfestjük. További felhasználásig a myeloma-sejteket jégén tartjuk.

3.3. Lépsejtszuspenzió előállítása

A lép kivételét egy előzőleg a 2. példa szerint immunált Balb/c-egérből, steril körülmények között, jéggel való hűtés közben végezzük.

Az előzőleg immunizált Balb/c-egert nyakcsavarással leöljük és a lépét sterilen kivesszük. Ehhez az egeret 70%-os etanolban tartjuk és steril műszerrel preparáljuk. A lépét óvatosan kivesszük és egy finom neylonhálóra helyezzük. Ezen a lépét finoman szétvágjuk és egy 5 ml-es fecskendő dugattyú segítségével óvatosan átnyomjuk a hálón anélkül, hogy sok sejtet elpusztítsunk. Az egész művelet során a hálót DSS-el öblítjük.

Az ily módon kapott sejtszuspenziót 50 ml-es műanyagcsőbe tesszük és 10 percig 300 g alkalmazása mellett 5 °C-on centrifugáljuk (MSE centrifuga, Modell Chilspin, UK). A sejteket ezt követően 20-20 ml BSS-el kétszer mossuk (10 perc; 300 g; 5 °C; MSE Chilspin) és a sejt pelletet a centrifugálás után 10 ml BSS-ben ismét szuszpendáljuk.

Az Sp 2/0-Ag 14 myeloma-sejtekkel való fúzióig a lépsejteket jégén tartjuk.

3.4. Fúzió: Lépsejtek és Sp 2/0-Ag 14 myeloma-sejtek

A fúzióhoz a myeloma-sejtek és a lépsejtek arányának 1 : 10 nagyságának kell lennie.

A lépsejteket (BSS-pufferben) és az Sp 2/0-Ag 14 myeloma-sejteket (BSS-pufferben) a megadott arányban összehozzuk és 10 percig, 300 g mellett, 5 °C hőmérsékleten centrifugáljuk (MSE centrifuga, Modell Chilspin). A pelletet ismét szuszpendáljuk BSS-pufferben és a szuszpenziót újból centrifugáljuk. A pelletet elővigyázatosan felkeverjük és 37 °C-os meleg vízfürdőbe állítjuk. Ezután 1 ml előmelegített és steril PEG-4000-et (MERCK) 60 másodperc leforgása alatt cseppenként hozzáadjuk a sejtekhez és közben az egész anyagot állandóan mozgatjuk. A sejteket ezt követően még 30 másodpercig tovább rázzuk mielőtt 5 ml előmelegített BSS-pufferhez (amely mentes Ca^{2+} , Mg^{2+} ionoktól) ugyancsak cseppenként hozzáadjuk körülbelül 5 perc leforgása alatt állandó keverés közben.

A leírt módon fuzionált sejteket ezután centrifugáljuk (10 perc; 300 g; 20 °C, MSE centrifuga, Modell Chilspin), a felülszót leszívjuk és elöntjük. A sejt pelletet 50 ml HAT-közegben újrassuszpendáljuk és az így kapott sejtszuspenziót előkészített 4 Costar-lapra (mikrotiterlapokra, amelyek 24 mélyedéssel rendelkeznek, amelyek átmérője mélyedésenként 24 mm; a

teljes felület a sejtnövekedésre 2,0 cm²) elosztjuk (0,5 ml mélyedésenként).

A Costar-lapok inkubálása 37 °C-on 6% CO₂-koncentrációnál történik.

5

4. példa

Hibridsejtek tenyésztése

Egy nappal a sejt fúzió után mélyedésenként 1 ml HAT-közeg a tenéslapokhoz adunk, majd 3-4 nappal a sejt fúzió után mikroszkóposan ellenőrizzük a fuzionált sejteket. Egyidejűleg az elhasznált közeg leszívjuk és 1 ml friss HAT-közeggel helyettesítjük. További 3 nap múlva (6-7 nappal a sejt fúzió után) ismét kicseréljük a tápközeg. A 7. naptól a 10. napig a sejt fúzió után számítva, mindegyik mélyedésben mikroszkóposan végigvizsgáljuk a hibrideket és a közeg 2-3-szor megújítjuk hetenként.

Mihelyt egy mélyedésben hibridek fejlődtek ki, a HAT-közeg HT-közegre cseréljük. A mosott hibrid tenyésztéről a felülszót rész (a mélyedés legalább 10%-át) egy steril Pasteur-pipettával leemeljük és megvizsgáljuk, hogy vannak-e benne antitestek.

Mihelyt a mélyedéseket teljesen benőtték a pozitív hibrid kolóniák, ezeket új Costar-lapokra RPMI 1640 közegbe átvisszük, mimellett egy teljesen benőtt mélyedés tartalmát 2-3 új mélyedésre elosztjuk.

25

5. példa

A pozitív hibridsejtek klónoztása

Egy pozitív mélyedés sejtjeit pipetta segítségével fellazítjuk és felvesszük, majd 1 ml közegben egy csőbe átvisszük. Ezt követően aliquot mennyiséget kivesszünk a sejtszám meghatározásához és FDA-val megfestjük (hígítás 1 : 2 FDA-val: 50 µk sejt + 50 µl színezék). Az előnyös sejtszám 10⁵ és 10⁶ sejt/ml között van. Ezt követően a hibridsejteket 1 : 100 arányban HT-közeggel hígítjuk (például 100 µl sejt + 9,9 ml HT-közeg).

Két 50 ml-es Falcon-csőbe beviszünk 25-25 ml HT-közeg és 5 ml makrofág-szuspenziót összesen 30 ml-re feltöltve csővenként. A makrofágokat előbb egy egérből izoláljuk és 10 ml HT-közegben újrassuszpendáljuk (3.1 szakasz).

Ezekben a makrofágokat tartalmazó Falcon-csövekben a hibridsejteket addig hígítjuk, ameddig a sejtsűrűség i) 270 sejt/30 ml, illetve ii) 90 sejt/30 ml nagyságot

el nem ér. Ezt követően ezeket az adagokat Costar-lapokon (mikrotiterlapok 96 mélyedéssel) elosztjuk, mimellett 200-200 µl-t adagolunk mindegyik mélyedésbe. Ez megfelel (i) 1,8 sejt/mélyedés, illetve (ii) 0,6 sejt/mélyedés sejtszámnak. Hígításonként ily módon 1,5 mikrotiterlapra van szükség.

7 nappal ezután az egyes mélyedéseket ellenőrizzük mikroszkóposan és megállapítjuk a mélyedések sejtklón tartalmát. Azokat a hígításokat, amelyeknél körülbelül 50% a mélyedések sejtklón tartalma, az ELISA-teszthez használjuk fel. Ennek rendszerint 0,6 sejt/mélyedés hígításnak kell lennie.

Körülbelül 7-10 nappal ezután a pozitív mélyedés-

60

sek (klónokkal) felülúszó részét egy ELISA-teszt során megvizsgáljuk és megállapítjuk, hogy mennyi monoklonális antitest van jelen, továbbá mennyire szaporodtak a pozitív klónok a Costar-lapokon (24 furattal) az RPMI 1640 közegben. E pozitív klónok egyenlő (aliquot) mennyiségeit cseppfolyós nitrogénben tároljuk.

6. példa

Hibridóma-szelektálás (ELISA-teszt)

Először 100 µl BSA-konjugált haptén-oldatot nátrium-karbonát pufferben (50 mmól, pH = 9,6) egy mikrotiterlap egyes mélyedéseibe adagolunk és az anyagot 4 °C-on nedves kamrában éjszakán át inkubáljuk. Ezt követően a mélyedéseket mindenkor 5-ször mossuk 0,1%-os PBS-Tween pufferrel. Az el nem foglalt kötési helyeknek, amelyek a mikrotiterlapon vannak, a blokkolására 200 µl PBSA-BSA oldatot (1%) adunk mindegyik mélyedésbe. Az így előkészített anyagot 1-2 óra hosszat szobahőmérsékleten inkubáljuk és ezt követően, 0,1%-os PBS-Tween pufferrel mossuk.

Minden egyes mélyedéshez ezután 200 µl hibridóma felülúszó anyagot adunk, amelyet 1 : 2 arányban PBS-Tweennel hígítottunk (0,1%) és az egészet 2 óra hosszat inkubáljuk szobahőmérsékleten. Ezt követően a mélyedéseket ismét 5-ször mossuk 0,1%-os PBS-Tween pufferrel.

Ezután inkubálás következik foszfátzsal konjugált kecske antiegr antitesttel együtt (Kirkegaard & Perry Lab.). Először 1 µl – affinitás-kromatográfia útján tisztított – kecske antitestet egér IgG-vel szemben, amely 1:500 arányban hígítva PBS-Tween-ben (1%) van jelen Kirkegaard & Perry Laboratories) és alkalikus foszfátzsal van jelölve, adunk minden egyes mélyedéshez.

Az inkubálási idő 1,5 óra szobahőmérsékleten. Ezt követően az egyes mélyedéseket ismét mossuk 1%-os PBS-Tween pufferrel (5-ször).

Ezután 150 µl szubsztátumtartalmú oldatot (1 mg/ml p-nitrofenil-foszfát) adunk mindegyik mélyedésbe. Ezután 2 óra hosszat inkubáljuk az anyagot sötétben, majd a spektroszkópiás meghatározás következik 405 nm-nél. Azok a pozitív hibridóma-sejtek, amelyek egy specifikus antitestet választanak ki, erős pozitív jelet adnak a választott hullámhossznál.

7. példa

Hibridóma-sejtek expanziója egérben

Az ascites folyadék képződésének elősegítésére 20-25 g tömegű nőstény Balb/c-egereket (Sisseln állatfarm, Svájc) 0,3 ml Pristan-olajjal (Aldrich Chemical) előkezelünk, amelyet intraperitoneálisan fecskendezünk be. A Pristan alkalmazása után 1-3 héttel egy második injekciót kapnak az egerek (0,2 ml Pristan-olaj, i. p.). Ezzel a második injekcióval egyidőben az állatok 2×10^6 hibridóma-sejtet kapnak 0,2 ml PBS-ben.

Az ebből a kezelésből származó ascites folyadékot összegyűjtjük, 800 g-nél centrifugáljuk és –20 °C-os hőmérsékleten tároljuk. Felengedés után az ascites folyadékot 1 óra hosszat 30 000 g mellett centrifugáljuk. A felső réteget, amely túlnyomóan lipideket tartalmaz, eltávolítjuk. Ezt követően meghatározzuk a

proteinkoncentrációt és 10 mg/ml értékre állítjuk be PBS hozzáadásával.

Az immunglobulin G-frakciót (IgG) 0 °C-on kicsapjuk 0,9 térfogatrész telített ammónium-szulfát-oldat hozzáadásával. Az IgG-frakciót 1 óra múlva pelletezzük egy órai centrifugálás után, amelyet 22 000 g mellett végzünk. A pelletet ezt követően 20 mmólos trisz-HCl pufferben, amelynek a pH-ja 7,9 és amely 50 mmól NaCl-t tartalmaz, feloldjuk és hasonló puffer ellenében éjszakán át dializáljuk 4 °C-on.

Az IgG-frakció további feldolgozását anioncserélő kromatográfia segítségével végezzük egy DE-52 dietil-aminoetil-cellulóz (Whatman) oszlopon. A próbát 1 : 2 (tf./tf.) arányban 20 mmólos trisz-HCl, pH = 7,9 pufferrel hígítjuk mindaddig, ameddig az NaCl végső koncentrációja 25 mmól nem lesz, majd 10 mg proteint 1 ml géltre számítva viszünk fel az oszlopra. Az eluálást úgy érjük el, hogy 25 mmól-ról 200 mmól-ra növeljük a NaCl-koncentrációt (lineáris gradiens). Általában a monoklonális antitestek eluálása 80 mmól NaCl tartományban megy végbe.

A frakciókat éjszakán át 4 °C hőmérsékleten PBS-el szemben dializáljuk és –70 °C-on tároljuk. A tisztasági fokot nátrium-dodecil-szulfát/poliakril-amid-gél-elektroforézissal (SDS-PAGE) határozzuk meg, valamint izoelektromos fókuszolás útján kapjuk.

A jelen esetben a tisztasági fok >90%.

8. példa

Metolaktór kimutatása

8.1: Közvetett ELISA (assay A)

A metolaktór kimutatása egy kétlépcsős, kompetitív ELISA-teszt segítségével történik enzimmel jelölt második antitest alkalmazása közben.

BSA-konjugált haptént először 50 mmól nátrium-karbonát-pufferben, amelynek a pH-ja 9,6 (200 ng BSA-konjugált haptén/100 µl nátrium-karbonát-puffer) mikrotiterlapokon (például Dynatech, Typ M 129A) adszorbeálunk és éjszakán át 4 °C hőmérsékleten inkubálunk. Kiderült az, hogy a konjugátum (BSA/haptén)-koncentrációnak 200 ng/100 µl nátrium-karbonát-puffer koncentrációról 50 ng/100 µl nátrium-karbonát-puffer koncentrációra való csökkentése a vizsgálat érzékenységét egy javított bevonat alapon csaknem 5-szörösére növelheti.

A lapokat ezt követően 5-ször mossuk PBS-pufferrel, amely 0,1 tf/tf poliszorbát 20-al (Twen 20) dúsítva van (PBS-Tween).

A szilárd vivőanyag maradék szabad kötőhelyeit ezután BSA-nak 1%-os oldat formájában való adagolásával blokkoljuk. Az inkubálást 22 °C-on végezzük két óra hosszat és utána a lapokat ismét mossuk 0,1%-os PBS-el.

50 µl 0,2 µg/ml töménységű, előzőleg tisztított monoklonális antitestet vagy sejtklón-felülúszó anyagot (1 : 5 arányú hígításban) a) 950 µl szabványos oldattal, amely növekvő részarányban tartalmaz metolaktórt, illetve metolaktór-analógot, b) metolaktórtartalmú vízmintákkal vagy c) metolaktór-tartalmú ta-

lajkivonatokkal együtt inkubálunk (a hígításokat PBS-Tweenben végezzük).

Az inkubálást 1 óra hosszat szobahőmérsékleten (22 °C-on) végezzük, utána 200 µl antigén/antitest-elegyet adunk mindegyik mikrotiterlap-mélyedéshez és az egészet további egy óra hosszat inkubáljuk. A mélyedéseket ezt követően 0,1%-os PBS-el 5-ször mossuk és 100 µl/mélyedésre számítva kecske-antigén IgG antitesttel, amely alkalikus foszfatázhoz kapcsolva van jelen (1 : 1500 arányú hígításban), felülrétegezzük és 1,5 óra hosszat inkubáljuk.

Újbóli mosás után mélyedésenként 150 µl, 1 mg/ml dietanol-amin-pufferben (1 mmól; pH = 9,8; 0,5 mmól MgCl₂·6H₂O oldattal feldúsítva) oldott p-nitrofenil-foszfát anyagot a mélyedésekhez hozzáadunk.

2 órai 22 °C-on történő inkubálás után színváltozást észlelünk, amely arányos azzal az antitest-mennyiséggel, amely a szilárd fázishoz kötött antigénnel reagált. A beindult színreakció erősségét 405 nm hullámhossznál határozzuk meg. Az egyes próbák hígításait úgy választjuk meg, hogy egy inhibitor (Bo) hozzáadása nélkül az abszorpciós értékeket 0,3–0,5 tartományban tartsuk. Kontroll számára (antitest hozzáadása nélkül és nem kimutatható mennyiségű antigénnel) R ≥ 0,005 értékeket kapunk. Mindegyik mintát három ismétlésben határozzuk meg.

8.2: Közvetlen ELISA (assay B)

Mikrotiterlapokat (Dynatech M 129A) bevonunk monoklonális antitesttel (például MAb 4082-25-4; 75 ng/100 µl 50 mmól nátrium-karbonát puffer, pH = 9,6 előállítását leírásunk II. Eredmények részének e) szakaszában ismertetjük) és ezeket éjszakán át 4 °C hőmérsékleten inkubáljuk.

A lapokat ezután 0,1 tf/tf%-os PBS-Tweenel 5-ször mossuk és ezt követően 2 óra hosszat PBS-el, amelyet 1 tömeg/tf%-os BSA-val feldúsítottunk, inkubáljuk annak érdekében, hogy a még szabad kötés helyeket blokkoljuk. Újbóli mosás után minden esetben 150 µl szabványos oldatot viszünk a mikrotiterlapok mélyedéseibe, amelyek növekvő mennyiségben tartalmaznak metolaktórt 0,1 tf/tf%-os PBS-Tweenben oldva. Ezt követi 1 órás inkubálás 22 °C-os hőmérsékleten.

Ezt követően mélyedésenként 50 µl haptén-enzim (alkalikus foszfatáz)-konjugátumot (2 µg/ml) adagolunk és az inkubálást további 1 óra hosszat folytatjuk. Újbóli mosás után mindegyik mélyedésbe 150 µl p-nitrofenil-foszfát szubsztátumot adunk 1 mg/ml dietanol-amin pufferben (1 mmól, pH = 9,8, feldúsítva 0,5 mmól MgCl₂·6H₂O-val), majd 2 órai, 22 °C-on történő, sötétben való inkubálás után 405 nm-nél meghatározzuk az abszorpciót.

8.3: Metolaktór-tartalom meghatározása

Valamely mintában lévő metolaktór mennyiségének a meghatározásához először egy kalibrációs görbét készítünk (1. ábra), amelyre a B/Bo×100 értékeket az inhibitor-koncentráció ellenébe felvisszük. Bo az abszorpcióképességet jelenti, amelyet metolaktórinhibitornak az antitesthez való hozzáadása nélkül mértünk,

és B azt az abszorpcióképességet mutatja, amelyet különböző koncentrációjú metolaktór-inhibitor hozzáadása esetén kaptunk. Az I₅₀-érték az antigénnek azt a koncentrációját mutatja, amelynél az antitestkötődés a szilárd fázishoz 50%-ban gátolva van. Az I₅₀-értéket egy a meglévő viszonyokhoz speciálisan hozzáigazított ENZFITTER (Leatherbarrow, Elsevier-Biosoft) görbekalkulációs program segítségével határozzuk meg, amely egy 4 paramétert magában foglaló logisztikai görbén alapszik (Raab GN, 1983). A mennyiségi metolaktór-meghatározást talaj- vagy vízmintában az ELISA keretében szintén az ENZFITTER-program segítségével végezzük, mimellett a görbe hozzáigazítása azokon a szabványokon alapszik, amelyek minden egyes mikrotiterlappal együtt futnak.

9. példa

Talajminták elemzése

Egyenlő mennyiségű (2 g) szabványosított talajmintákat, amelyek különböző eredetűek, extraktorban 4 óra hosszat extrahálunk 80/20 arányú (tf/tf) 20 ml-nyi metanol/víz-eleggyel. A kompetitív ELISA számára a talajkivonatokot szokásosan 1 : 40 arányban hígítjuk 0,1%-os PBS-Tweenben annak érdekében, hogy megelőzzük a monoklonális antitest metanol által okozható lehetséges denaturálódását. Ezt követően a hígított talajmintákat (950 µl) az előzőekben leírt módon a specifikus anti-metolaktór antitesttel (MAb 4082-85-4) (50 µl) elegyítjük és ezt követően a vívőanyaghoz kötött hapténnel inkubáljuk (közvetett ELISA) vagy közvetlenül a vívőanyaghoz kötött anti-metolaktór antitestekkel reagáltatjuk és utána enzim-mel jelölt antigénnel inkubáljuk (közvetlen ELISA).

10. példa

Vízminták elemzése

A kompetitív ELISA számára 100 µl 10-szeres koncentrált PBS-Tween puffert hozzáadunk 850 µl vízmintához. A metolaktór-meghatározást ezután az előzőekben leírt módon végezzük (9. példa).

II. Eredmények

a) Monoklonális antitestek előállítása

Összesen 24 sejtfúziót létesítünk myeloma-sejtek és lépsejtek között, amelyeket előzőleg egy KHL-metolaktórral immunált BALB/c egérből izoláltunk. A fúzió hatásfoka körülbelül 90%. Az ily módon kapható sejtklonációból 7 termel monoklonális antitesteket, amelyek ELISA-teszt során nagyon erős reakciót mutatnak. Ezeket korlátozott hígítómódszer segítségével klónozzuk.

Ily módon 7 monoklonális antitestet kaphatunk, amelyek közül egy [mely a MAb 4082-25-4 jelölést kapta; (IgG1 alosztály)] nagyon nagy affinitást mutat metolaktórral szemben, míg a fennmaradó 6 monoklonális antitest affinitása a metolaktór-származékokra korlátozódik.

Ezt az antitestet arra használjuk, hogy két kompetitív (versengő) immunvizsgálatot fejlesszünk ki. Ezeknek a vizsgálatoknak az egyike olyan mikrotiterlapon alapszik, amelyeket BSA-haptén-konjugátummal

vontunk be, valamint enzimmel jelölt kecske/antigén antitestek használatán nyugszik (közvetett ELISA).

A másik vizsgált haptén-enzim-konjugátumot, valamint antitesttel bevont mikrotiterlapokat alkalmaz (közvetlen ELISA). tegyük vizsgálat kimutatja a metolaktórt a ppb tartományban. A közvetlen ELISA sokkal kevésbé érzékeny, mint a közvetett, és ezért sokkal gyorsabb. Az I_{50} -értékek a közvetlen ELISA esetén 1,0 ng/ml-nél, a közvetett ELISA esetén pedig 0,6 ng/ml-nél vannak. A kimutatási tartomány metolaktórra pufferben 0,1 ng/ml és 10 ng/ml között van, mellett a legkisebb kimutatási határt az a koncentráció határozza meg, amely szükséges ahhoz, hogy a kötött antitestek bizonyos százalékos növekedését elérjük, amely a vakérték kétszeres szabványelérésének felel meg. A variációs koefficiens ismétlődő meghatározások számára az 1 ppb tartományban 11% (20 meghatározás).

A MAb 4082-25-4 keresztreaktivitása közvetett kompetitív ELISA segítségével határozható meg. Ahogy az 1. táblázat mutatja egy 1,4%-os gyenge keresztreaktivitást találunk a metolaktórnak a szerkezetileg nagyon közel álló hidroximetabolitjánál (A vegyület). A többi metabolit nem mutat semmilyen keresztreaktivitást (<0,1%). A monoklonális antitest nem kötődik más klór-acetanilid-herbicidekhez és rokon vegyületekhez, így például alaktórhoz, furalaxilhoz és a mataxilhoz (<0,1%).

Letétbehelyezés:

A találmány keretében előállított és alkalmazott hibridóma-sejtvonalak (4082-25-4) a Nemzetközi Letétbehelyezési Helyként elismert „European Collection of Animal Cell Cultures” (ECACC) Salisbury, UK, helyen a budapesti szerződés követelményeinek megfelelően a mikroorganizmusok letétbe helyezésének nemzetközi elismerésére szabadalmaztatás céljára az ECACC 9002 1701 letétbehelyezési számon került letétbe. Nyilatkozatot a letétbe helyezett minták életképességéről az említett Nemzetközi Letétbehelyezési Hely készít.

III. Közegek és pufferok

(A) RPMI 1640-közeg

RPMI 1640 (Seromed) következő adalékokkal:

borjúsérum	15%
L-glutamin	4 mmól
gentamicin	0,01%
nátrium-piruvát	1 mmól
2-merkaptoetanol	50 μ mól
inzulin	5 μ mól
transzferin	5 μ mól
szelén (ITS)	5 μ mól

(B) HAT-közeg

1 liter RPMI 1640 közeg 20 ml HAT-konc. (50 $\times$) Boehringer adalékkal, amely a következő összetétellel rendelkezik:

Hypoxanthin 680	5,0 mg/l
Aminopterin	8,8 mg/l
Thymidin	193,8 mg/l

(C) HT-közeg

1 liter RPMI 1640 közeg 20 ml HT-konc. (50 $\times$) Boehringer adalékkal, amely a következő összetétellel rendelkezik:

5 Hypoxantin 680	5,0 mg/l
Thymidin	193,8 mg/l

(D) BSS-puffer

(Earle-féle sóoldat Ca és Mg nélkül, pH = 7,4)

10 KCl	7,3 mmól
NaCl	116,0 mmól
NaHCO ₃	26,0 mmól
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	1,0 mmól
glukóz	5,5 mmól
15 fenolvörös	48,0 mmól
Penicillin/Sztreptomycin-oldat 1 tf/1% adaléka (Sero-med) (10 000 E penicillin, 10 mg/ml sztreptomycin)	

(E) Nátrium-karbonát-puffer (pH = 9,6)

20 Na ₂ CO ₃	477,0 mg
NaHCO ₃	879,0 mg
NaN ₃	1,8 mg
300 ml H ₂ O-hoz	

(F) PBS-puffer (pH = 7,0)

25 NaCl	8,5 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1,28 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,436 g
1000 ml H ₂ O-hoz	

(G) PBS-TWEEN-20 (0,1%)

1 ml Tween-20 (Serva) + 1000 ml PBS

(H) PBS-BSA (1%)

35 BSA	5,0 g
NaN ₃ (0,5 mól)	3,0 ml
500 ml PBS-hez	

(I) Szubsztrátum-puffer

(dietanol-amin-puffer, pH = 9,8)

40 dietanol-amin	97,0 ml
NaN ₃ (0,5 mól)	6,0 ml
MgCl ₂ ·6H ₂ O	100,0 mg
1000 ml H ₂ O-hoz, a pH beállítása 9,8-ra tömény	

45 HCl-lel.

A szubsztrát előállítása: közvetlenül a használat előtt a p-nitrofenil-foszfát-szubsztrát 5 mg-os szubsztrát-tablettáját (Sigma 104) 5 ml szubsztrát-pufferben oldjuk.

1. táblázat

A legismertebb metolaktór-analógok keresztreaktivitása a találmány szerinti MAb 4082-25-4-el (Az A-N metolaktór-analógokat képletükkel a 2. táblázatban írjuk le.)

Vegyület	I_{50} (ng/ml)*	Keresztreaktivitás (%)**
metolaktór	0,6	100
alaktór	1000	<0,1
A	43	1,4

Vegyület	I ₅₀ (ng/ml)*	Keresztreaktivitás (%)**
B	1000	<0,1
C	1000	<0,1
D	1000	<0,1
E	1000	<0,1
F	1000	<0,1
G	1000	<0,1
H	1000	<0,1
I	1000	<0,1
J	1000	<0,1

5

10

Vegyület	I ₅₀ (ng/ml)*	Keresztreaktivitás (%)**
K	1000	<0,1
L	1000	<0,1
M	1000	<0,1
N	1000	<0,1

* I₅₀ = inhibitor-koncentráció 50%-os gátlásra kompetitív ELISA esetén

** Keresztreaktivitás = metolaklór-koncentráció 50%-os gátlásra/metolaklóranalóg-koncentráció 5%-os gátlásra × 1000

2. táblázat

A 2. táblázat a (III) általános képletnek megfelelő legismertebb metolaklór-analógokat mutatja be az 1. táblázatban felsorolt vegyületeknek megfelelően szerkezeti képletek formájában.

Vegyület	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
metolaklór	C ₂ H ₅	CH ₃	COCH ₂ Cl	CH(CH ₃)CH ₂ OCH ₃
alaklór	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	COCH ₂ Cl	CH ₂ OCH ₃
A	C ₂ H ₅	CH ₃	COCH ₂ OH	CH(CH ₃)CH ₂ OCH ₃
B	C ₂ H ₅	CH ₃	H	CH(CH ₃)CH ₂ OCH ₃
C	C ₂ H ₅	CH ₃	COCH ₂ Cl	H
D	C ₂ H ₅	CH ₃	COCH ₂ OH	H
E	C ₂ H ₅	CH ₃	H	CH(CH ₃)CH ₂ OC
F	C ₂ H ₅	CH ₃	COCH ₂ OH	CH(CH ₃)CH ₂ OH
G	CH ₃	CH ₃	COCH ₂ OCH ₃	CH(CH ₃)COOH
H	CH ₃	CH ₃	COCH ₂ OH	CH(CH ₃)COOH
I	CH ₃	CH ₃	H	CH(CH ₃)COOCH ₃
J	CH ₃	CH ₃	COCH ₂ OCH ₃	H
K	CH ₃	CH ₃	H	CH(CH ₃)COOH
L	CH ₃	CH ₃	COCH ₂ OCH ₃	CH(CH ₃)COOCH ₃
M	CH ₂ OH	CH ₃	COCH ₂ OCH ₃	CH(CH ₃)COOCH ₃
N	CH ₃	CH ₃	a) képletű csoport	CH(CH ₃)COOCH ₃

IV. Irodalom

- Ercegovich CD et al., J Agric, Food Chem., 29:559–563, 1981
- Feng et al., J. Agric Food Chem., 38: 159–163, 1990 45
- Fleeker J., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 70: 874–878, 1987
- Hargrave HS és Merkle MG., Weed Sci., 19: 1971
- Kawamura H, Berzovsky JA., J. Immunol., 136: 58, 1986
- Kelley M. et al., J. Agric. Food Chem., 33: 962–965, 1985 50
- Köhler G, Milstein, Nature, 256: 495–497, 1975
- Kulkarni NP. et al., Cancer Res., 41: 2700–2706, 1981
- Littlefield JW., Science, 145: 709, 1964
- Newsome WH., J. Agric. Food Chem., 33: 528–530, 1985 55
- Raab GM., Clin. Chem., 29: 1757–1761, 1963
- Schlaeppli J–M. et al., J. Aric. Food Chem., 37: 1532–1538, 1989
- Shulman M. et al., Nature, 276: 269–270, 1978 60
- van Rensburg E., Analyst, 110: 733, 1985
- Wie SI, Hammock BD., J. Agric. Food Chem., 30: 949–857, 1982

Szabadalmi irodalom

4 530 786 számú USA-beli szabadalmi leírás.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás hibridóma-sejtvonal előállítására, amely olyan monoklonális antitesteket termel, mely antitestek metolaklór iránt nagy fajlagosságot és affinitást mutatnak, és lényegében semmilyen keresztreaktivitást nem mutatnak a legismertebb, szerkezetileg rokon metolaklór-analógokkal, *azzal jellemezve*, hogy
- i) egy hapténként szolgáló metolaklór-származékot szintetizálunk és egy vívőanyag-molekulával konjugálunk,

- ii) egy donorállatot az így kapott konjugátummal immunizálunk,
- iii) egy immunkompetens B-sejtet izolálunk az immunizált donorállatból,
- iv) az említett immunkompetens B-sejtet egy folytonos sejtosztódásra képes tumor-sejtvonallal fuzionáljuk,
- v) a keletkező hibridsejteket elkülönítjük, alkalmas tápközegben tenyésztjük, majd a pozitív hibridsejteket klónozzuk, és
- vi) a klónozott hibridómák közül szelektáljuk a metolaktórt felismerő monoklonális antitesteket termelő sejteket.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hapténként olyan (I) általános képletű metolaktór-származékokat szintetizálunk, amelyek a metolaktór aminfunkciójához viszonyítva 4-es helyzetben egy $R-(CH_2)_n-O$ -csoporttal rendelkeznek, amelyben R jelentése $-COOH$, $-NH_2$ vagy $-SH$ csoport, és n értéke 1-től 10-ig terjedő egész szám.

(Elsőbbsége: 1990. 10. 23.)

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy vivőanyag-molekulaként olyan makromolekuláris vegyületeket alkalmazunk, amelyek a metolaktór-származékkal végbemenő kapcsolási reakcióhoz hozzáférhető reakcióképes csoportokat tartalmaznak.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 10 000 és 1 500 000 közötti molekulatömegű, lizinben gazdag proteint alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

5. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy proteinként marha szérumalbumint (BSA), Keyhole Limpet hemocianint (KLH), humán szérumalbumint (HSA), sertés tiroglobulint, B2 mikroglobulint, hemocianint, immunglobulint, toxint, poliszacharidot, lipopoliszacharidot, természetes vagy szintetikus poliadenil- vagy poliuridilsavat, polialanil- vagy polilizin-polipeptideket vagy sejtmembrán-komponenseket alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a metolaktór-származékot a vivőanyag-molekulához közvetlenül konjugálunk.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a metolaktórt a vivőanyag-molekulához hídtagon keresztül konjugálunk.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hídtagként egy vagy több olyan reaktív csoportot tartalmazó molekularészt alkalmazunk, amely reaktív csoport(ok) képesek a vivőanyag-molekula reaktív csoportjaival kölcsönhatásba lépni.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy reakcióképes csoportként karboxi-, amino- vagy SH-csoportot alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

10. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemez-*

ve, hogy az i) lépésben a konjugálási reakciót az aktív észtermódszer segítségével hajtjuk végre.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

11. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a ii) lépésben a donorállatok immunizálását a vivőanyaghoz kötött metolaktórt tartalmazó konjugátum egyszeri vagy többszöri beadásával végezzük.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a beadást intravénás, intraperitoneális vagy szubkután injekció vagy ezek kombinációja formájában végezzük.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

13. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az iv) lépésben a donorállatból származó immunkompetens sejtek fúziójához olyan tumorsejtvonalakat alkalmazunk, amelyek maguk nem termelnek monoklonális antitesteket.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy tumorsejtvonalként az Sp 2/0-Ag 14 vagy az X63-Ag8.653 jellemző tulajdonságaival rendelkező moelóma-sejtvonalakat alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

15. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az iv) lépésben fúziós közegként olyan puffertoldatot alkalmazunk, amely a sejtek fuzionálására szokásosan alkalmazott fúziós promotorok egyikét tartalmazza az alábbiak közül: Sendai-vírusok vagy más paramyxivírusok, kalciumionok, felületaktív lipidek vagy polietilénlikol.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

16. A 15. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy fúziós promotorként 600–6000 átlagos molekulatömegű polietilénlikolt alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

17. A 16. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a polietilénlikolt a fúziós közegben 30–60 t% koncentrációban alkalmazzuk.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

18. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a v) lépésben a fuzionált hibridsejteket elkülönítésére a HAT-szelekciós közeget alkalmazzuk.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

19. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az v) lépésben a hibridsejteket izolált makrofágok („feeder-sejtek”) jelenlétében tenyésztjük.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

20. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az v) lépésben a pozitív, monoklonális antitesteket termelő hibridsejt-tenyészeteket korlátozó hígításos eljárás segítségével elválasztjuk, és ezt követően alkalmas tápközegekben klónozzuk.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

21. A 20. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a vi) lépésben a klónozott hibridóma-sejtkló-nokat immunvizsgálat segítségével, a megfelelő monoklonális antitestek készésére megvizsgálva szelektáljuk.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

22. A 21. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy enzimkapcsolásos immunvizsgálatot vagy radio-immunvizsgálatot alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

23. Eljárás metolaklór iránt nagy specifitással és affinitással rendelkező monoklonális antitestek előállítására, amelyek lényegében semmilyen keresztreaktivitást nem mutatnak a legismertebb, szerkezetileg rokon metolaklór-analógokkal, *azzal jellemezve*, hogy az 1–22. igénypontok bármelyike szerint előállított hibridóma-sejtvonalakat in vivo vagy in vitro tenyésztjük, és a termelt monoklonális antitesteket elkülönítjük.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

24. A 23. igénypont szerinti eljárás monoklonális antitestek előállítására, *azzal jellemezve*, hogy olyan hibridóma-sejtvonalakat tenyésztünk, amely az ECACC 9002 1701 jellemző tulajdonságaival rendelkezik.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

25. A 23. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy alkalmas tápközegben in vitro tenyésztést végzünk.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

26. A 25. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szabványosított táptalajokat, így Dulbecco által módosított Eagle-féle táptalajt (DMEM) vagy RPMI 1640-et használunk, amelyeket adott esetben emlősszérumok hozzáadásával, növekedést fokozó adalékokkal vagy nyomelemekkel egészítünk ki.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

27. A 23. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az említett monoklonális antitesteket az 1–22. igénypontok bármelyike szerint előállított hibridóma-sejtvonalak expanziója útján valamely donorállatban in vivo termeljük.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

28. Eljárás metolaklór immunológiai kimutatására, *azzal jellemezve*, hogy a 23–27. igénypontok bármelyike szerint előállított monoklonális antitestet valamely ismert immunvizsgálatban alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

29. A 28. igénypont szerinti eljárás metolaklór immunológiai kimutatására, *azzal jellemezve*, hogy az immunvizsgálatban olyan monoklonális antitestet alkalmazunk, melyet az ECACC 9002 1701 jellemző tulajdonságaival rendelkező hibridóma-sejtvonal vagy ennek klónja vagy szubklónja termel.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

30. A 28. vagy 29. igénypont szerinti eljárás, *az-*

zal jellemezve, hogy kompetitív immunvizsgálatot végzünk.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

31. A 28. vagy 30. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy immunvizsgálatként radio-immunvizsgálatot (RIA), enzimkapcsolásos immunvizsgálatot (ELISA) vagy kemilumineszcenciás vizsgálatot végzünk.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

32. A 31. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy enzimkapcsolásos immunvizsgálatként közvetett ELISA-tesztet alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1990. 10. 23.)

33. A 31. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy enzimkapcsolásos immunvizsgálatként közvetlen ELISA-tesztet alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1990. 10. 23.)

34. Teszt-kit metolaklór immunológiai kimutatására felhasználásra kész formában, *azzal jellemezve*, hogy a szokásosan alkalmazott vívőanyagok, reagensek és egyéb adalékanyagok mellett reagensként legalább egy, a 23–27. igénypontok szerinti eljárással előállított monoklonális antitestet tartalmaz.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

35. A 34. igénypont szerinti, felhasználásra kész teszt-kit, *azzal jellemezve*, hogy monoklonális antitestként legalább egy olyan antitestet tartalmaz, amelyet az 1–22. igénypontok bármelyike szerinti eljárással előállított és az ECACC 9002 1701 jellemző tulajdonságaival rendelkező hibridóma-sejtvonal vagy annak klónja vagy szubklónja termel.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

36. Eljárás egy (II) általános képletű, valamely vívőanyag-molekulához hozzákapcsolható metolaklór-származék előállítására, amely a metolaklór aminfunkciójához viszonyított 4-es helyzetben egy $R-(CH_2)_nO$ -csoportot tartalmaz, ahol R jelentése $-COOH$, $-NH_2$ vagy $-SH$ csoport, és n jelentése 1 és 10 közötti egész szám, *azzal jellemezve*, hogy egy (II) általános képletű vegyületet – a képletben R és n jelentése a tárgyi körben megadott – a reakció szempontjából közömbös oldószerben, enyhe reakciókörülmények között, $-10\text{ }^{\circ}C$ és $+30\text{ }^{\circ}C$ közötti hőmérsékleten megfelelő klór-ecetsav-származékkal N-acilezünk.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

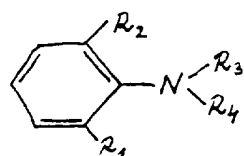
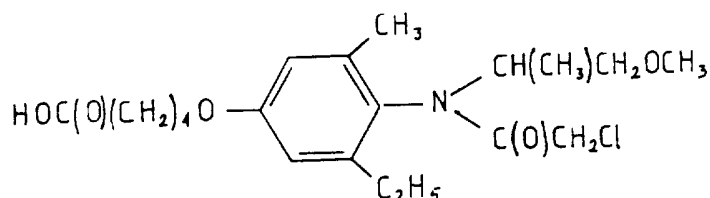
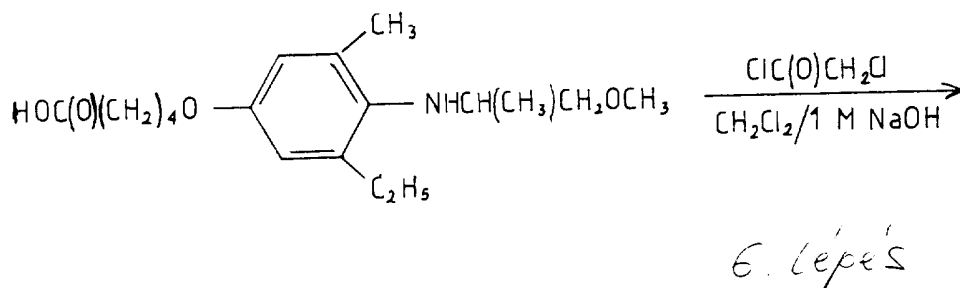
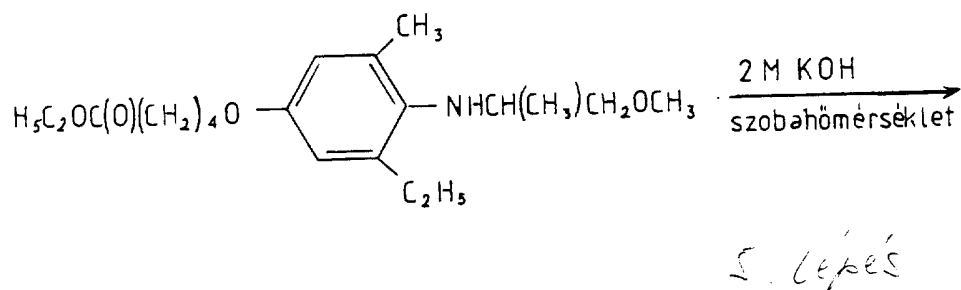
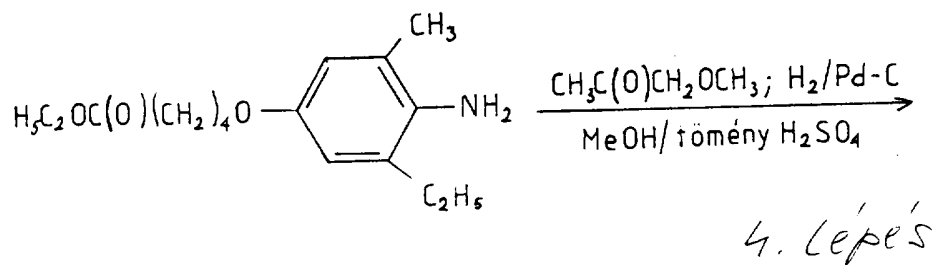
37. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az ECACC 9002 1701 jellemző tulajdonságait mutató hibridóma-sejtvonalat állítjuk elő.

(Elsőbbsége: 1990. 03. 09.)

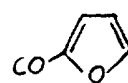


A, Reakciövázlat





(III)



(a)