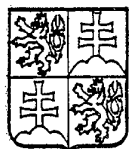


ČESKÁ
A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ
ÚŘAD PRO
VYNÁLEZY

(21) Číslo přihlášky: **3421-89**

(22) Přihlášeno: 07. 06. 89

(40) Zveřejněno: 18. 11. 92

(47) Uděleno: 31. 12. 92

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 17. 03. 93

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁵:

C 12 N 7/00

C 12 N 5/12

A 61 K 39/395

(73) Majitel patentu:

Hilgert Ivan RNDr. CSc., Praha, CS;
Křištofová Hana RNDr., Praha, CS;
Hořejší Václav RNDr. CSc., Praha, CS;
Štefanová Irena RNDr., Trutnov, CS;
Štolba Pavel MUDr. CSc., Praha, CS;
Bendlová Běla RNDr., Praha, CS;
Lebl Michal ing. CSc., Praha, CS;

(72) Původce vynálezu:

Hilgert Ivan RNDr. CSc., Praha, CS;
Křištofová Hana RNDr., Praha, CS;
Hořejší Václav RNDr. CSc., Praha, CS;
Štefanová Irena RNDr., Trutnov, CS;
Štolba Pavel MUDr. CSc., Praha, CS;
Bendlová Běla RNDr., Praha, CS;
Lebl Michal ing. CSc., Praha, CS;

(54) Název vynálezu:

**Způsob přípravy myších monoklonálních
protilátek proti C-peptidu lidského
proinsulinu**

(57) Anotace:

Jedná se o způsob přípravy myších monoklonálních protilátek proti C-peptidu lidského proinsulinu. Způsob zahrnuje postup k získání hyperimunizovaných myší, jejichž slezinné buňky jsou použity k přípravě hybridomů produkujících monoklonální protilátky vhodné pro použití ke kvantitativnímu stanovení koncentrace C-peptidu lidského proinsulinu nebo ke stanovení lidského proinsulinu.

Vynález se týká způsobu přípravy myších monoklonálních protilátek proti C-peptidu lidského proinsulinu.

Tyto monoklonální protilátky mohou být využity hlavně v klinické diagnostice u diabetiků k analytickému stanovení C-peptidu lidského proinsulinu v seru a moči pacientů.

C-peptid je součástí proinsulinu syntetizovaného v beta-buňkách Langerhansových ostrůvků pankreatu. Ještě v beta-buňce je většina proinsulinu (86 aminokyselin) rozštěpena na insulin (51 aminokyselin), C-peptid (31 aminokyselin) a dva dipeptidy. Z beta-buněk vychází insulin a C-peptid v ekvimolárním poměru 1:1 a současně malá část ještě nerozštěpeného proinsulinu (do 20%).

Lidský insulin má stejnou imunoreaktivitu jako insuliny zvířecí, které jsou používány k léčbě diabetiků (neshoda v 1 aminokyselině v případě insulinu vepřového a ve 3 aminokyselinách v případě insulinu hovězího). Proto u diabetiků léčených insulinem není stanovený insulin ukazatelem sekrece z vlastních Langerhansových ostrůvků. U takových diabetiků podá informaci o zbytkové sekreci pouze vyšetření C-peptidu lidského proinsulinu.

Protilátky proti C-peptidu lidského proinsulinu lze dosud vyrábět tak, že C-peptid je opakovaně injikován jako antigen pokusným zvířatům, nejčastěji morčatům. Sérum takto imunizovaných zvířat, odebírané po určité době působení antigenu, slouží jako zdroj protilátek užívaných zejména pro kvantitativní stanovení C-peptidu lidského proinsulinu v séru nebo moči metodou radioimunologické nebo enzymoanalytické analýzy. Tento postup, nazývaný konvenční imunizací, má několik nevýhod. V séru imunizovaných zvířat se nachází heterogenní směs protilátek, tzv. polyklonálních, jejichž spektrum je v každém jednotlivém organismu různé a neopakovatelné. Výrobní šarže konvenčních sér se proto dají těžko standardizovat a vycházejí z výroby v širokém rozmezí kvality.

Nevýhodu konvenčních sér proti C-peptidu v principu odstraňuje použití hybridomové technologie. Produkt hybridomu - monoklonální protilátka - je namířen proti jediné antigenní determinantě. Tento přístup, tj. příprava hybridomů produkujících monoklonální protilátky specificky rozeznávající C-peptid lidského proinsulinu, byl použit v následujících publikacích: Madsen O.D., Cohen R.M., Fitch F.W., Rubinstein A.H., Steiner D.F.: The production and characterization of monoclonal antibodies specific for human proinsulin using a sensitive microdot assay procedure. *Endocrinology* 113:2135-2144, 1983; Madsen O.D., Frank B.H., Steiner D.F.: Human proinsulin - specific antigenic determinants identified by monoclonal antibodies. *Diabetes* 33:1012-1016, 1984. Monoklonální protilátky specifické pro lidský proinsulin jsou používány zatím pouze k výzkumným účelům. Monoklonální protilátky C-peptidu lidského proinsulinu s určením pouze k imunohistochemii jsou uvedeny v katalogu firmy Novo (Dánsko). Tyto monoklonální protilátky proti C-peptidu lidského proinsulinu nebyly dosud připraveny s takovými parametry (nízká asociační konstanta), aby mohly být využity pro sestavení diagnostické soupravy. C-peptid lidského proinsulinu se dosud stanovuje soupravami za-

loženými na polyklonálních antiserech např. Biodata-Serano nebo v roce 1989 zaváděná souprava Ústavem pro výzkum, výrobu a využití radioizotopů, Praha.

Normální hodnoty C-peptidu v séru či plasmě zdravých osob na lačno jsou 0,3-0,9 $\mu\text{mol/l}$ (tj. 1-3 ng/ml), při stimulaci dochází ke zvýšení o 150-200 %. Do moči je C-peptid vylučován v kvantu 9-45 $\mu\text{mol/24}$ hod., tzn. v koncentracích 4-25 $\mu\text{mol/l}$. Zvláště vyšetření C-peptidu v moči pomocí radioimunologické analýzy vyžaduje vysoce specifické protilátky (vzhledem k přítomnosti mnoha štěpů jiných bílkovin v moči). Polyklonální protilátky nemají dostatečnou specifitu pro universální využití.

Tento nedostatek malé specifičnosti může být odstraněn použitím monoklonálních protilátek získaných způsobem podle vynálezu, jehož podstatnou je, že po imunizaci samic kříženců inbredních myší kmenů B10.A a BALB/c navázáním C-peptidu lidského proinsulinu na bílkovinné nosiče - hovězí albumin nebo thyreoglobulin, emulgováním těchto v adjuvans a podkožním podáním, se slezinové buňky z imunizovaných myší sfúzí s buňkami myelomové linie Sp 2/0 - Ag14 a vzniklé hybridomy se adaptují k růstu in vivo v peritoneu myší inbredního kmene BALB/c, načež se z 1 ml ascitické tekutiny produkované hybridomy v peritoneu myší izoluje 4 - 10 mg monoklonálního imunoglobulinu proti C-peptidu lidského proinsulinu s asociační konstantou v systému $^{125}\text{I-Tyr-C-peptid/C-peptid}$ v rozmezí od $K = 10^7$ 1/mol do 10^{10} 1/mol.

Zvláště popsany postup imunizace k získání hyperimunních myší je nejdůležitější krok přípravy monoklonální protilátky proti C-peptidu lidského proinsulinu. Tento postup byl vybrán jako optimální a z mnoha zkoušených.

a) Postup imunizace myší

Samice kříženců inbredních myších kmenů B10.A a BALB/c byly několiknásobně imunizovány C-peptidem lidského proinsulinu jednak navázaného na hovězí thyreoglobulin, jednak na hovězí albumin. Na bílkovinný nosič navázaný antigen byl emulgován v kompletním nebo inkompletním adjuvans (Bacto adjuvant incomplete/complete-Freund, Difco Laboratories). Tyto imunogenní formy antigenu byly myším podávány podkožně na břišní stranu a do tlapek. U kříženců (B10.A x BALB/c) myši lépe odpovídají na C-peptid lidského proinsulinu než homozygoti.

b) Příprava hybridomů produkujících monoklonální protilátky proti C-peptidu lidského proinsulinu

Hybridomy byly získány na principu známém z odborné literatury (Fazekas de St. Groth, S., Sheidigger, D.: Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics, J. Immunol. Meth. 35:1-21, 1980; Galfré, G., Howe, S.C., Milstein, C., Butcher, G.W., Howard, J.C.: Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines, Nature 266: 550, 1977). Pozitivita specifických protilátek byla sledována v sérech myší imunizovaných C-peptidem. Z myší, jejichž séra byla pozitivní v ře-

dění 1:500 (zjišťovaná pomocí radioimunologického precipitačního testu) byly odebrány sleziny a použity k fúzi s buňkami myší myelomové linie Sp2/0-Ag14. Buňky z 1 sleziny byly po fúzi nanесeny do osmi 96 jamkových destiček s plochým dnem. Z několika fúzí byly získány 3 hybridomy produkující protilátky proti C-peptidu lidského proinsulinu. Stabilita hybridomů byla kontrolována trojnásobnou klonací.

c) Adaptace hybridomů k růstu in vivo v myších inbredního kmene BALB/c

Pro množení hybridních buněk v myších kmene BALB/c bylo nutné hybridomové buňky vzniklé fúzí slezinové buňky heterozygotní myši kříženců (B10.A x BALB/c) adaptovat na růst in vivo. Vykloňované hybridové buňky produkující monoklonální protilátku byly aplikovány v množství 5×10^6 buněk do peritoneální dutiny myší kříženců (B10.A x BALB/c). Aby došlo k lepšímu uchycení aplikovaných buněk, byla myš 7 dní před přenosem buněk hybridomu ovlivněna "Pristanem" (2,6,10,14-Tetramethylpentadecane, Sigma, USA) (0,3 ml intraperitoneálně). Po 20 dnech růstu hybridomu v peritoneální dutině byla myš uhubena a buňky (5×10^6) byly přeneseny do peritoneální dutiny bezthymových myší (nu-nu). Příjemcům byl podán opět 7 dní před přenosem buněk hybridom "Pristan". Po 20 dnech růstu hybridomu v peritoneu byla myš uhubena a buňky (10^7) byly přeneseny do peritoneální dutiny myší kmene BALB/c předem ovlivněných "Pristanem". Ve většině myší kmene BALB/c hybridom rostl. Adaptované hybridomy na růst v kmenu myší BALB/c byly po pomnožení v tkáňové kultuře zamrazeny a uchovávány v tekutém dusíku.

d) Způsob biosyntézy monoklonálních protilátek in vivo

Adaptované buňky hybridomů injikované do peritoneální dutiny myší BALB/c jsou schopny produkovat ascitickou tekutinu, která obsahuje za ekonomicky výhodných podmínek velké množství monoklonální protilátky. Z ascitické tekutiny je možné izolovat monoklonální imunoglobulin např. několikanásobným přesrážením 50 % nasycením síranem amonným. Výhodou monoklonální protilátky oproti protilátce polyklonální (viz úvod) je hlavně v tom, že monoklonální protilátka reaguje s určitým místem (jednou determinantou) na molekule C-peptidu lidského proinsulinu. Tato reakce je vysoce specifická. Hybridomy produkující monoklonální protilátky proti C-peptidu lidského proinsulinu je možné kultivovat in vitro v médiích vhodných pro živočišné buňky a jsou adaptovány pro růst in vivo v peritoneální dutině myší kmene BALB/c. Z konserv uchovávaných v kapalném dusíku je možné zajistit produkci protilátky bez potřeby dalšího antigenu. Monoklonální protilátky reagují s C-peptidem lidského proinsulinu a není třeba se zbavovat protilátek balastních. Tímto způsobem mohou být získány monoklonální protilátky s vysokou asociační konstantou, a proto jich může být použito pro analytické stanovení c-peptidu lidského proinsulinu v séru a moči pacientů RIA metodou. Aplikací oblastí je tedy klinická diagnostika u diabetiků. Dále jsou monoklonální protilátky použitelné ke stanovení lidského proinsulinu imunoradiometrickou metodou (IRMA) či metodou ELISA. Aplikací oblastí je

zde diagnostika nádorů vycházejících z beta-buněk Langerhansových ostrůvků (nesidiom - "insulinom"), familiární hyperproinsulinemie a studium sekrece insulinu a proinsulinu za jiných patologických stavů. Dá se předpokládat využití monoklonálních protilátek proti C-peptidu lidského proinsulinu pro imunohistochemické a imunocytochemické analýzy, včetně elektromikroskopických, zaměřených na studium biosyntézy proinsulinu a proinsulinu za normálních a patologických stavů a řešení otázky internalizace proinsulinu. Monoklonální protilátka může být využita v průběhu biosyntetické výroby lidského insulinu, včetně kontroly kvality konečného produktu.

Příklad 1

Monoklonální protilátky proti C-peptidu lidského proinsulinu jsou produkovány hybridními buňkami vzniklými fúzí buněk myši myelomové linie Sp2/O-Ag14 a buněk, získaných ze sleziny F_1 hybridů myších kmenů B10.A x BALB/c imunizovaných C-peptidem lidského proinsulinu podle schématu popsaného v následující tabulce:

Tabulka

Schema imunizace myši F_1 (B10.A x BALB/c) C-peptidem lidského proinsulinu

dávka	den podání	způsob podání a množství na 1 dávku	forma antigenu ¹
1.	0. den	s.c.; 50 µg/0,2 ml;břicho	kompl. adjuvans ²
2.	21. den	s.c.; 50 µg/0,2 ml;tlapky	nekompl. adjuvans ²
3.	35. den	s.c.; 50 µg/0,2 ml;břicho	kompl. adjuvans ²
4.-5.	50. a 51. den	i.v. a 2x 15 µg/0,2 ml; ocasní vena	roztok ve fyziol. roztoku
6.-7.	52. a 53. den	i.p. a 2x 30 µg/0,2 ml	roztok ve fyziol. roztoku

¹C-peptid navázaný na hovězí thyreoglobulin byl použit u dávek 1, 2 a 3. C-peptid navázaný na hovězí albumin byl použit při 4.-7. dávce.

²Bacto adjuvant incomplete (complete) Freund, Difco Laboratorie.

Lidský syntetický 1-Tyr-C-peptid, který byl připraven ve spolupráci Ústavu organické chemie a biochemie ČSAV a Výzkumného ústavu endokrinologického v Praze (B. Bendlová, M. Lebl, P. Štolba, L. Stárka) byl připojen na hovězí thyreoglobulin nebo albumin na principu jednostupňové glutaraldehydové reakce (Avrameas, S., Ternynck, T.: The crosslinking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunosorbents, *Immunochemistry* 6:53-66, 1969). Reakční poměr albumin: C-peptide-glutaraldehyd

byl 1:10:100. Kvalita konjugátu byla sledována stanovením imuno-reaktivity při RIA, připojením ^{125}I -Tyr-C-peptidu a připojením Tyr-C-peptid-Ile s následnou analýzou aminokyselin. Takto bylo stanoveno, že na 1 mol albuminu bylo navázáno asi 7 mol C-peptidu a na 1 mol thyreoglobulinu asi 40 mol C-peptidu.

Příklad 2

Hybridomové buňky produkující monoklonální protilátky proti C-peptidu lidského proinsulinu rostou in vitro jako polosuspenní kultury. Základním kultivačním médiem je Eaglovo minimální esenciální médium s Hanksovou solnou směsí doplněné o neesenciální aminokyseliny, L-glutamin (3 mM), pyruvát sodný (1 mM). Toto médium (označované jako RPMI, Ústav molekulární genetiky ČSAV) je pro kultivaci hybridomů doplněno penicilinem, streptomycinem, gentamycinem, 2-merkaptetanolem (0,05 mM), pufrem Hepes (kyselina N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-2 ethansulfonová) (10 mM) a inaktivovaným bovinním sérem (Bioveta, Ivanovice na Hané, 10 %). Hybridomy jsou kultivovány při 37 °C.

Příklad 3

Za účelem pomnožení adaptovaných hybridomových buněk na růst in vivo bylo aplikováno 5×10^6 buněk do peritoneální dutiny myši kmene BALB/c. Aby došlo k lepšímu uchycení aplikovaných buněk, byla myš 10 dní před přenosem buněk hybridomu ovlivněna parafinovým olejem (0,5 ml intraperitoneálně). Po 10 dnech růstu hybridomu v peritoneální dutině byla myš uhubena a naprodukováná ascitická tekutina odebrána. V případě hybridomu produkujícího monoklonální protilátku C-PEP-01 bylo celkem získáno 2 ml ascitické tekutiny, která obsahovala 9 mg/ml imunoglobulinu. Produkováná protilátka je monoklonální imunoglobulin podtřídy IgG1 s lehkými řetězci typu kapa, její isoelektrický bod je v rozmezí pH 6,0-6,7.

Příklad 4

Vyšetření C-peptidu pomocí radioimunologické analýzy vyžaduje protilátky o co nejvyšší specifitě a co nejvyšší afinitě. Monoklonální protilátky C-PEP-01, C-PEP-02, C-PEP-03 reagují specificky s C-peptidem lidského proinsulinu a lidským proinsulinem (preparát od firmy Lilly, USA). Nereagují s lidským a vepřovým insulinem, lidským glukagonem a vepřovým proinsulinem (preparát od firmy Novo, Dánsko), lidským somatostatinem (preparát od firmy Serono, Itálie). Nejvyšší asociační konstantu ze tří testovaných monoklonálních protilátek má monoklonální protilátka C-PEP-01, která má asociační konstantu v systému ^{125}I -Tyr-C-peptid/C-peptid: $K = 1,1 \cdot 10^9$ l/mol. Obě zbývající monoklonální protilátky C-PEP-02 a C-PEP-03 mají $K = 10^7$ l/mol.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

Způsob přípravy vyšších monoklonálních protilátek proti C-peptidu lidského proinsulinu vyznačující se tím, že po imunizaci samic kříženců inbredních myší kmenů B10.A a BALB/c navázáním C-peptidu lidského proinsulinu na bílkovinné nosiče - hovězí albumin nebo thyreoglobulin, emulgováním těchto v adjuvans a podkožním podáním, se slezinné buňky z imunizovaných myší sfúzí s buňkami myelomové linie Sp 2/0 - Ag14 a vzniklé hybridomy se adaptují k růstu in vivo v peritoneu myší inbredního kmene BALB/c, načež se z 1 ml ascitické tekutiny produkované hybridomy v peritoneu myší izoluje 4 - 10 mg monoklonálního imunoglobulinu proti C-peptidu lidského proinsulinu s asociační konstantou v systému 125 I-Tyr-C-peptid/C-peptid v rozmezí od $K = 10^7$ l/mol do 10^{10} l/mol.

Konec dokumentu
