

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

263 122

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 05 11 87
(21) PV 7925-87.S

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 5/00

(40) Zveřejněno 16 08 88
(45) Vydáno 15 01 90

(75)
Autor vynálezu

HILGERT IVAN RNDr. CSc.,
KRIŠTOFOVÁ HANA RNDr.,
HOŘEJŠÍ VÁCLAV RNDr. CSc., PRAHA,
ŠTEFANOVÁ IRENA RNDr., TRUTNOV,
ANGELISOVÁ PAVLA RNDr. CSc., PRAHA

(54)

Myší lymfocytární hybridom produkující protilátku
proti lidskému alfa-fetoproteinu

Řešení se týká myšího lymfocytárního hybridomu, produkujícího protilátku proti lidskému alfa-fetoproteinu, uloženého ve sbírací hybridomů Ústavu molekulární genetiky CSAV pod označením IMG CZAS AFP-11. Samotná monoklonální protilátka hybridomu AFP-11 je vhodná pro použití v radioimunologické analýze ke stanovení alfa-fetoproteinu a v senníčkovém enzymoimunologickém testu v kombinaci s jinými monoklonálními protilátkami připravenými v Ústavu molekulární genetiky CSAV (AFP-01 nebo AFP-02) ke stanovení koncentrace lidského alfa-fetoproteinu.

Vynález se týká nového hybridomu, tj. hybridního jednobuněčného organismu, sestrojeného fúzí buňky myší myelomové linie Sp2/O-Ag14 a myší slezinné lymfoidní buňky, produkující protilátku proti lidskému alfa-fetoproteínu.

Protilátky proti alfa-fetoproteínu se mohou vyrábět tak, že alfa-fetoprotein je opakovaně injikován jako antigen pokusným zvířatům, nejčastěji králíkům. Sérum takto imunizovaných zvířat, odebírané po určité době působení antigenu, slouží jako zdroj protilátek, užívaných zejména pro kvantitativní stanovení plasmatického alfa-fetoproteínu metodou radioimunologické nebo enzymoimunoanalytické analýzy. Tento postup, nazývaný konvenční imunizací, má několik nevýhod. V séru imunizovaných zvířat se nachází heterogenní směs protilátek, jejichž spektrum je v každém jednotlivém organismu různé a neopakovatelné. Organismus zpravidla vytvoří kromě protilátek vůči žádanému antigenu i protilátky proti nečistotám antigenního preparátu. Výrobní šarže konvenčních sér se proto dají těžko standardizovat a vycházejí z výroby v širokém rozmezí kvality.

Nevýhodu konvenčních sér proti alfa-fetoproteínu v principu odstraňuje použití hybridomové technologie. Produkt hybridomu - monoklonální protilátka - je namířena proti jediné antigenní determinantě. Je-li konstruován dostatečně velký soubor hybridomů je pravděpodobné, že se z něho podaří vyhledat hybridom syntetizující protilátku, která je namířená proti určité antigenní determinantě molekuly lidského alfa-fetoproteínu. Znamená to, že mohou být konstruovány klony molekulárních protilátek proti různým antigenním determinantám řetězce molekuly alfa-fetoproteínu. Výhodnost získání monoklonálních protilátek proti několika antigenním determinantám je hlavně v možnosti využití kombinací protilátek namířených proti různým deter-

minantám ke zvýšení citlivosti analytických testů pro stanovení alfa-fetoproteinů v tělních tekutinách. Tento přístup, tj. příprava hybridomů produkujících monoklonální protilátky specificky rozeznávající alfa-fetoprotein, byl použit několika autory (např. Tsung, Y.-K., Milunsky, A., Alpert, E.: Derivation and characterization of a monoclonal hybridoma antibody specific for human alpha-fetoprotein, J. Immunol. Meth. 39:363-368, 1980; Stenman, U.H., Sutinen, M.L., Selander, R.K., Tontti, K., Schröder, J.: Characterization of a monoclonal antibody to human alpha-fetoprotein and its use in affinity chromatography, J. Immunol. Meth. 46:337-345, 1981; Uotila, M., Ruoslahti, E., Engvall, E.: Two-site sandwich enzyme immunoassay with monoclonal antibodies to human alpha-fetoprotein, J. Immunol. Meth. 42: 11-15, 1981; Hunter, W.M., Bennie, J.G., Brock, D.J.H., Van Heyningen, V.: Monoclonal antibodies for use in an immunoradiometric assay for α -foetoprotein, J. Immunol. Meth. 50:133-144, 1982; Van Heyningen, V., Barron, L., Brock, D.J.H., Crichton, D., Lawrie, S.: Monoclonal antibodies to human α -foetoprotein: analysis of the behaviour of three different antibodies, J. Immunol. Meth. 50:123-131, 1982). Bylo též popsáno použití sendvičového enzymoimunologického testu s využitím dvou monoklonálních protilátek ke stanovení koncentrací alfa-fetoproteinů v biologických vzorcích (Uotila a spol., viz výše uvedená citace). Tato metoda má výhodu v tom, že při ní není potřeba používat vysoce čištěného radioaktivně značeného antigenu, že je rychlá a jednoduchá. Monoklonální protilátky použité pro sestavení sendvičového enzymoimunologického testu autory Uotila a spol. byly získány ze supernatantů tkáňových kultur hybridomů, v nichž jsou koncentrace monoklonálních protilátek velmi nízké. Uvedenými autory byly pozorovány nepříznivé nespecifické efekty neředěného lidského séra, které byly odstraněny teprve ředěním vzorků 1:10.

Tyto nevýhody odstraňuje použití monoklonální protilátky produkované hybridomem uloženým ve Sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV v Praze 4, Vídeňská č. 1083 pod

označením IMG CZAS AFP-11. Tento hybridom dobře roste jak ve tkáňové kultuře in vitro, tak in vivo v peritoneální dutině myší kmene BALB/c, takže je možno v ascitické tekutině produkovat za ekonomicky výhodných podmínek velké množství monoklonální protilátky. Monoklonální protilátku AFP-11 je možno použít v kombinaci s jinými monoklonálními protilátkami (AFP-01 nebo AFP-03) připravenými v Ústavu molekulární genetiky ČSAV k sestavení sendvičového enzymoimunologického testu. V tomto uspořádání se neprojevují nepříznivé vlivy způsobené neřaděnými vzorky lidského séra.

Uvedený hybridom byl získán způsobem známým z odborné literatury (Fazekas de St. Groth, S., Scheidigger, 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) klonováním souboru hybridních buněk, vzniklých fúzí buněk myší myelomové linie Sp2/O-Ag14 a buněk, získaných ze sleziny myší kmene BALB/c, imunizovaných lidským alfa-fetoproteinem.

Výhodou hybridomu je, že produkuje homogenní protilátku, tzv. protilátku monoklonální, která je schopna specificky reagovat s lidským alfa-fetoproteinem. Hybridom AFP-11 je možné kultivovat in vitro v médiích vhodných pro živočišné buňky a je adaptován pro růst in vivo v peritoneální dutině myší kmene BALB/c. Z konzerv, uchovávaných v kapalném dusíku, je možné zahájit produkci protilátky bez dalšího antigenu. Protilátka, produkováná hybridomem AFP-11, reaguje s lidským alfa-fetoproteinem a není třeba se zbavovat protilátek balastních.

Příklad 1

Za účelem pomnožení hybridomových buněk in vivo bylo aplikováno 5×10^6 buněk do peritoneální dutiny myší. Aby došlo k lepšímu uchycení aplikovaných buněk, byla myš 14 dní

před přenosem buněk hybridomu ovlivněna parafinovým olejem (0.5 ml intraperitoneálně). Po 10 dnech růstu hybridomu v peritoneální dutině byla myš zabita a naprodukováná ascitická tekutina odebrána. Celkem bylo získáno 2 ml ascitické tekutiny, která obsahovala 3,5 mg/ml imunoglobulinu. Protilátka AFP-11 reagovala se specifickým antigenem (lidským alfa-fetoproteinem) v enzymoimunologickém testu (při použití prasečí antimyší protilátky značené křenovou peroxidázou) až do ředění 1:10⁶ a v radioimunologickém precipitačním testu (při použití králičího antiséra proti myššímu imunoglobulinu a polyethylenglykolu k precipitaci komplexů antigen-monoklonální protilátka) až do ředění 1:10⁵. Monoklonální protilátku AFP-11 bylo možno použít ke stanovení alfa-fetoproteinu pomocí precipitačního radioimunologického testu v oboru koncentrací 5-200 ng/ml, při použití ascitické tekutiny ředěné 1:10⁵.

Příklad 2

Monoklonální protilátku AFP-11 bylo možno použít pro stanovení koncentrace alfa-fetoproteinu v sendvičovém enzymoimunologickém testu v kombinaci s jinými monoklonálními protilátkami proti alfa-fetoproteinu (AFP-01 nebo AFP-03), a to s použitím imobilizované protilátka AFP-11 a protilátky AFP-01 nebo AFP-03 konjugované s peroxidázou, nebo s použitím imobilizované protilátky AFP-01 a protilátky AFP-11 konjugované s peroxidázou.

Příslušná monoklonální protilátka (AFP-11 nebo AFP-01) byla částečně čištěna z ascitické tekutiny srážením nasyceným roztokem síranu amonného do 50% nasycení, naředěna fyziologickým roztokem na koncentraci 50±200 µg/ml a imobilizována adsorpcí na povrch jamek polystyrenových kultivačních destiček s plochým dnem (1 h při 37°C). Po promytí jamek fyziologickým roztokem byla zbývající adsorpčně aktivní místa na polystyrenovém povrchu jamek blokována inkubací s roztokem želatiny ve fyziologickém roztoku (2 h, 37°C). Vzorke standardu lidského séra (0,1 ml) obsahující známé koncentrace alfa-fetoproteinu

(0,200 ng/ml) byly inkubovány v takto připravených jamkách 16 h při 4°C a po promytí fyziologickým roztokem bylo přidáno 0,1 ml roztoku konjugátu příslušné monoklonální protilátky (AFP-01, AFP-03 nebo AFP-11) s peroxidázou ^{připraven} (metodou popsanou v odborné literatuře (Tijssen, P., Kurstak, E.: Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase-antibody conjugates for enzyme immunoassays, Anal. Biochem. 136:451-457, 1984), naředěn na koncentraci 10-100 µg/ml v 50% hovězím séru ve fyziologickém roztoku). Po 2 h inkubaci při 4°C byly jamky promyty fyziologickým roztokem, bylo přidáno 0,1 ml substrátového roztoku (0,1% roztok o-diaminobenzen dichloridu v 0,1 M fosfátovém pufru pH 6,0 obsahujícím 0,02% peroxid vodíku) a po 10-20 minutách byla chromogenní enzymatická reakce zastavena přidáním 0,1 ml 2 M roztoku kyseliny sírové a byla změřena intenzita vzniklého zabarvení spektrofotometrií při 492 nm (OD₄₉₂). Jako negativní srovnávací vzorek, k němuž byly získané hodnoty vztahovány, byl použit standard lidského séra neobsahující žádný alfa-fetoprotein detekovatelný komerční radioimunologickou soupravou. Typické hodnoty OD₄₉₂ byly 0,05-0,2 pro vzorky obsahující 10 ng/ml alfa-fetoproteinu a 0,7-1,2 pro vzorky obsahující 100 ng/ml, v závislosti na použité imobilizované monoklonální protilátce, na použitém konjugátu monoklonální protilátky s peroxidázou a na jeho ředění. Tyto hodnoty ukazují, že s využitím uvedených monoklonálních protilátek lze sestavit sendvičový enzymoimunologický test, použitelný pro stanovení koncentrací alfa-fetoproteinu v diagnosticky žádoucím oboru koncentrací (alespoň > 10 ng/ml).

Buňky hybridomu AFP-11 mají ultrastrukturní obraz typických myelomových buněk. In vitro rostou jako polosuspenní kultury. Základním kultivačním médiem je Eaglovo minimální esenciální médium s Hanksovou solnou směsí doplněné o neesen-ciální aminokyseliny, L-glutamin (3 mM), pyruvát sodný (1 mM). Toto médium (označené jako RPMI, Ústav molekulární genetiky ČSAV) je pro kultivaci hybridomu AFP-11 doplněno penicilinem, streptomycinem, gentamycinem, 2-merkaptotetanolem (0,05 mM), puftrem

HEPES (kyselina N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethan-sulfonová) (10 mM) a inkativovaným bovinním sérem (Bioveta, Ivanovice na Hané, 10%). Hybridom je kultivován při 37°C. Střední generační čas je 20,2 hod. Produkovaná protilátka je monoklonální imunoglobulin podtřídy IgG1 s lehkými řetězci typu K, její isoelektrický bod je v rozmezí pH 5,7 až 6,0.

Monoklonální protilátka, produkovaná hybridomem AFP-11 reaguje specificky s lidským alfa-fetoproteinem.

Hybridom AFP-11 může být průmyslově využíván jako zdroj monoklonální protilátky proti lidskému alfa-fetoproteinu v metodách analytických nebo preparativních.

Monoklonální protilátka hybridomu AFP-11 může být využita pro analytické stanovení alfa-fetoproteinu při klinické diagnostice ve zdravotnických zařízeních, zvláště pro diagnózu nádorových onemocnění (hepatomy, teratomy atd.) nebo kongenitální malformace (rozštěp páteře - spina bifida plodu).

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS AFP-11, vyznačující se tím, že produkuje monoklonální protilátku podtřídy I IgG1 proti lidskému alfa-fetoproteinu.