



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

265 473

(11) (B1)

(13)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 5/00

(22) Přihlášeno 01 07 86

(21) PV 4952-86.Z

(40) Zveřejněno 10 02 89

(45) Vydáno 15 12 89

(75)
Autor vynálezu

HOLÁŇ VLADIMÍR RNDr. CSc., VANČATOVÁ ALENA RNDr., MACHALA OLDŘICH RNDr. CSc.,
BOUKALOVÁ JITKA PhMr., MANČAL PETR RNDr., PRAHA,
KUMIČÁKOVÁ ESTERA RNDr., KOŠICE, HRABA TOMÁŠ MUDr. DrSc.,
MADAR JINDŘICH MUDr. CSc., PRAHA

(54) **Myší lymfocytární hybridom produkující protilátku proti lidskému choriogonadotropnímu hormonu**

(57) Řešení se týká myšího lymfocytárního hybridomu produkujícího protilátku proti lidskému choriogonadotropnímu hormonu (HCG), který je uložen ve Sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV pod označením IMG CZAS H-3F11. Samotné monoklonální protilátky jsou vhodné pro výrobu nových diagnostických souprav pro časnou diagnostiku gravidity.

Vynález se týká nových hybridomů, tj. hybridních buněčných linií, které byly sestrojeny fuzí buněk myelomové linie SP2/O a myších slezinných buněk produkujících protilátky proti lidskému choriogonadotropnímu hormonu (HCG). Tento hormon je prokazatelný v krvi a v moči těhotných žen a zcela chybí u netěhotných. Jeho výskyt v organismu začíná po implantaci oplozeného vajíčka (okolo. 8 dne po ovulaci) a koncentrace HCG pak prudce stoupá. Na průkazu přítomnosti HCG v organismu jsou založeny diagnostické testy v těhotenství.

Potřeba časné a spolehlivé diagnostiky těhotenství vyvstává nyní zvláště v souvislosti se zaváděním miniinterupcí, jejichž provedení je vázáno na první týdny po početí. S tím také vzrůstají požadavky na zvýšení citlivosti a spolehlivosti diagnostických testů.

Dosavadní diagnostické testy využívají imunologické reakce konvenčních antisér připravených imunizací králíků purifikovaným HCG. Sérum imunizovaných zvířat je zdrojem protilátek pro imunologické testy. Nevýhodou přípravy těchto konvenčních antisér je požadavek na vysoce purifikovaný hormon pro jejich přípravu a jednotlivé šarže antisér se liší svou aktivitou a obsahují značně heterogenní směs protilátek. Je známo, že HCG a další podobné hormony (LH, FSH) mají vysokou podobnost svého alfa řetězce a části beta řetězce a proto polyvalentní konvenční protilátky proti HCG reagují i s těmito hormony. Z důvodu určité basální koncentrace LH i u netěhotných žen aglutinační testy využívající konvenční protilátky nejsou schopné specificky prokázat méně než 500 IU HCG/l a těhotenství tak může být těmito protilátkami prokázáno až za 7 až 10 dnů po vynechání menzes.

Nevýhody variability konvenčních antisér a křížové reaktivity polyvalentních protilátek odstraňuje hybridomová technologie.

Pomocí rozsáhlého vyhledávacího testování je možné vyselektovat takové produkty hybridomů - monoklonální protilátky, které reagují jen s jedinou antigenní determinantou na beta podjednotce HCG, která je specifická pro molekulu HCG, a která chybí na molekulách ostatních hormonů. Taková monoklonální protilátka je využitelná pro specifickou detekci HCG. To umožňuje zcitlivění doposud používaných aglutinačních testů a zavedení nových forem diagnostických testů, jako jsou testy enzymoimunologické a radioimunologické.

Využití monoklonálních protilátek proti HCG umožňuje zcitlivění detekce HCG. Úspěšná příprava monoklonálních protilátek proti HCG byla již v zahraničí popsána a monoklonální protilátky jsou využívány pro citlivou diagnostiku gravidity. Nový hybridom produkující protilátku proti HCG je uložen ve Sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV v Praze 6, Flemingovo nám. 2 pod označením IMG CZAS H-3F11.

Uvedený hybridom byl získán fuzí slezinných buněk z BALB/c myši opakovaně imunizovaných HCG s buňkami myelomové linie SP2/O způsobem známým z odborné literatury (Fazekas de St. Groth, S., Scheidigger, D.: Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics. J. Immunol. Methods 35:1, 1980) a klonováním získané populace hybridních buněk.

Hybridom H-3F11 je možné kultivovat in vitro v médiích vhodných pro živočišné buňky a jsou adaptovány pro růst in vivo v peritoneální dutině myši kmene BALB/c. Buňky hybridomů, H-2F11 jsou uchovávány v kapalném dusíku a po jejich rozmražení je možné zahájit produkci monoklonálních protilátek bez dalšího požadavku na antigen.

Základním kultivačním médiem pro buňky hybridomu H-3F11 je Eaglovo minimální esenciální médium s Hanksovou solnou směsí obohacené o neesenciální aminokyseliny. Toto médium (označované H-MEM- Ústav molekulární genetiky ČSAV) je pro kultivace hybridomů doplněno antibiotikami (penicilin, streptomycin) a 10 % inaktivovaného telecího séra. Hybridom je kultivován při 37 °C a produkované protilátky jsou monoklonální imunoglobuliny podtřídý IgG1. Tyto protilátky reagují v enzymoimunologickém testu (ELISA) s částečně purifikovanou beta podjednotkou HCG, s celou molekulou HCG, ale nereagují s preparáty močových proteinů netěhotných žen (obsahujícími LH, FSH a další bílkoviny).

Příprava monoklonální protilátky

2×10^6 hybridomových buněk je aplikováno do peritoneální dutiny myším kmene BALB/c, kterým byl 7 až 10 dnů před podáním hybridomových buněk injikován do peritoneální dutiny 1,0 ml parafinového oleje. Po 10 až 14 dnech růstu hybridomů se u myší vytváří v peritoneální dutině ascitická tekutina (4 až 6 ml/myš), která obsahuje 2 až 4 mg protilátky/ml (imunoglobulin). Tato může být purifikována z ascitické tekutiny precipitací síranem amonným.

Protilátky přítomné v ascitické tekutině po růstu hybridomu H-3F11 reagují v enzymoimunologickém testu (ELISA) s HCG při ředění do titrů více než 1:10 000 a aglutinují krvinky s navázaným HCG. Mohou tak nahradit polyvalentní antiséra v doposud užívaných aglutinačních testech sloužících k diagnostice gravidity a mohou se stát základními reagenty pro zavedení nových enzymoimunologických a radioimunologických testů pro časnou diagnostiku gravidity.

P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS H-3F11, produkující monoklonální protilátku podtřídy IgG1 proti lidskému choriogonadotropnímu hormonu (HCG).