



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

260066

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 5/00

(22) Přihlášeno 17 02 87

(21) PV 1040-87.A

(40) Zveřejněno 15 03 88

(45) Vydáno 15 05 89

(75)

Autor vynálezu

HOLÁŇ VLADIMÍR RNDr. CSc., ZAJÍCOVÁ ALENA RNDr.,
ŠTORCHOVÁ HELENA RNDr., PRAHA

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

Jedná se o prostředek použitelný
k časnému průkazu těhotenství a ke sledová-
ní úspěšnosti léčby některých nádorových
onemocnění. Podstatou je monoklonální
protilátka proti lidskému choriogonadotrop-
nímu hormonu /HCG/. Myší lymfocytární
hybridom IMG CZAS H-3G4 je uložen ve Sbírce
hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV
v Praze.

Vynález se týká myšího mynocytyárního hybridomu produkujícího monoklonální imunoglobulin proti lidskému choriogonadotropnímu hormonu. Jedná se o hybridní buněčnou linii, která byla sestavena fúzí buněk myelomové linie SP2/0 a myších slezinových 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 na 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 diagnostického testu.

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 důvodů určité basální koncentrace LH i u netěhotných žen aglutinační testy využívající konvenční protilátky nejsou schopné specificky prokázat méně než 50 IU HCG/l a tudíž těhotenství tak nemůže být těmito protilátkami prokázáno dříve než za 7 až 10 dní po vynechání menzes.

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 dosud 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.

Podstatou vynálezu je myší lymfocytyární hybridom produkující monoklonální imunoglobulin proti lidskému choriogonadotropnímu hormonu uložený ve Sbírce hybridomů ÚMG ČSAV v Praze 6, Flemingovo nám. 2, pod označením IMG CZAS H-3G4.

Uvedený hybridom byl získán fúzí slezinových buněk z BALB/c myší opakovaně imunizovaných HCG s buňkami myelomové linie SP2/0 způsobem známým z odborné literatury /Fazekas de St. Groth, S., Scheidigger, D. : J. Immunol. Methods 35: 1, 1980/ a klonováním získané populace hybridních buněk. Hybridom H-3G4 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. Buňky hybridomu H-3G4 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-3G4 je Eaglovo minimální esenciální médium s Hankovou solnou směsí obohacené o neesenciální aminokyseliny. Toto médium /označované H-MEMd - Ústav molekulární genetiky ČSAV/ je pro kultivace hybridomů doplněno antibiotiky /penicilin, streptomycin/ a 10 % inaktivovaného telecího séra. Hybridom je kultivován při 37 °C a produkovaná protilátka je monoklonální imunoglobulin podtřídy IgG1. Tato protilátka reaguje v enzymoimunologickém testu /ELISA/ s částečně purifikovanou beta podjednotkou HCG, s celou molekulou HCG, ale nereaguje s preparáty močových proteinů netěhotných žen /obsahující hormony 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 dní před podáním hybridomových buněk injikován do peritoneální dutiny 1,0 ml pristanu /2,6,10,14-tetrametylpentadekan/ nebo parafinové oleje. Po 7 až 12 dnech růstu hybridomů se u myší vytváří v peritoneální dutině ascitická tekutina /4-6 ml/myš/, která obsahuje 1 až 3 mg protilátky, na ml. Imunoglobulin může být částečně purifikován z ascitické tekutiny precipitací síranem amonným.

Protilátka přítomná v ascitické tekutině reaguje v enzymoimunologickém testu /ELISA/ s HCG při ředění do titru více než 1:100 000. V radioimunologických testech /RIA/ vykazuje tato protilátka specifickou reaktivitu s HCG při jejím pracovním ředění do titru 1:340 000 a může prokázat méně než 50 mIU HCG/ml. Vykazuje rychlejší ustavení chemické rovnováhy reakce s antigenem než doposud používané polyvalentní protilátky. Monoklonální protilátka produkovaná hybridomem H-3G4 byla již ověřena na souborech pacientek s počátečními stádii gravidity a s nádorovými onemocněními urogenitálního traktu a byla prokázána její vhodnost pro výrobu souprav RIA a ELISA testů ke klinickému průkazu HCG.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS H-3G4, produkující monoklonální imunoglobulin proti lidskému choriogonadotropnímu hormonu.