

(11) Patent numeris: **3879**

(51) Int. Cl.⁵: **C12N 5/20**
C12P 21/08

(21) Paraiškos numeris: **IP1867**

(22) Paraiškos padavimo data: **1994 01 31**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 08 25**

(45) Patent paskelbimo data: **1996 04 25**

(72) Išradėjas:

Aurelija Žvirblienė, LT
Mykolas Mauricas, LT
Vladas-Algirdas Bumelis, LT

(73) Patent savininkas:

Biotechnologijos institutas "FERMENTAS",
V. Graičiūno g. 8, 2028 Vilnius, LT

(74) Patentinis patikėtinis:

Liudmila Gerasimovič, 9, J. Basanavičiaus g. 16/5-41, 2009 Vilnius, LT

(83) Mikroorganizmo deponavimas:

H 0304, H 0305, Biotechnologijos institutas "Fermentas", LT

(54) Pavadinimas:

Hibridomos, produkuojančios pelės monokloninius antikūnus prieš
žmogaus augimo hormoną

(57) Referatas:

Šis išradimas yra iš imuninės biotechnologijos srities. Jo esmė - naujų hibridomų sukūrimas ir monokloninių antikūnų prieš žmogaus augimo hormoną gavimas.

Hibridomos skiriasi nuo anksčiau aprašytų analogų pagal motininių ląstelių kilmę, hibridizacijos būdą bei produkuojamų monokloninių antikūnų specifiškumą. Monokloniniai antikūnai gali būti pritaikyti žmogaus augimo hormono nustatymui.

Išradimas yra iš imuninės biotechnologijos srities. Jo esmė - naujų hibridomų sukūrimas ir monokloninių antikūnų (MA) prieš žmogaus augimo hormoną gavimas.

Hibridinių ląstelių linijos (hibridomos GH-1 ir GH-2) - tai MA prieš žmogaus augimo hormoną producentai. Abi šios ląstelių linijos gautos tuo pačiu metodu, charakterizuojamos tais pačiais požymiais. Jos skiriasi pagal vieną savybę - GH-1 ir GH-2 produkuojami MA atpažįsta skirtingus epitopus žmogaus augimo hormono molekulėje.

Hibridomų GH-1 ir GH-2 analogais gali būti laikomos hibridinių ląstelių linijos, produkuojančios MA prieš žmogaus augimo hormoną - A64-D/E3, A64-E/C8, A64-E/B12 ir A64-D/F2 [DD 263537, A61K39/395, 1987] ir prieš jaučio augimo hormoną - WME 2/3 [SU 1564184, A61K39/395, 1988]. Hibridomos GH-1 ir GH-2 skiriasi nuo hibridomos WME 2/3 pagal produkuojamų MA specifiškumą (WME 2/3 produkuoja MA prieš jaučio augimo hormoną), o nuo hibridomų A64-D/E3, E/C8, E/B12, D/F2 - pagal imunizacijai naudoto antigeno struktūrą, hibridizacijos būdą ir motininį ląstelių (mielomos) kilmę.

Šio išradimo tikslas - sukurti hibridomas, kurios produkuoja specifinius antikūnus prieš žmogaus augimo hormoną. Tam tikslui pelės buvo imunizuotos rekombinantiniu žmogaus augimo hormonu, po to imunizuotų pelių blužnies limfocitai sukryžminti su pelių mieloma NS0/1 pagal Kiolerio ir Milšteino metodu [Kohler,

Milstein, Eur. J. Immunol., 1976, 6, 511-919]. Atlikus hibridinių lastelių tikrinimą ir klonavimą, buvo gautos hibridomos GH-1 ir GH-2.

Hibridomos deponuotos Biotechnologijos institute "Fermentas": GH-1 deponavimo numeris H 0304, GH-2 deponavimo numeris - H 0305.

Hibridomas GH-1 ir GH-2 apibūdina šie požymiai.

Morfologiniai požymiai. Hibridinės lastelės yra sferinės formos, su lygiais kraštais, turi stambų branduolį. Dauginasi suspensijoje, pasižymi silpna adhezija ant stiklo arba plastiko paviršiaus.

Lastelių kultūros požymiai. Kultivavimo sąlygos standartinės: terpė DMEM su 10% embrioninio karvių serumo, 2 mM L-gliutamino, 20 mM HEPES buferio, 200 µg/ml gentamicino, auginama 37°C temperatūroje, 5% CO₂ atmosferoje. Lastelių auginimui naudojami stiklo arba plastiko indai, persėjama kas 3-4 dienos, persėjimo dozė - 100 tūkst. last./ml.

Auginimas gyvūnų organizme. Singeninių pelių BALB/c organizme hibridomos GH-1 ir GH-2 100% atveju sukelia ascitą, suleidus į pilvo ertmę 1-2 mln. lastelių. Likus 7-10 dienų iki lastelių injekcijos, pelės sensibilizuojamos 0,5 ml pristano. Ascitas formuojasi, praėjus 8-12 dienų po hibridinių lastelių injekcijos.

Kriokonservavimas. Ilgalaikiam saugojimui lastelės užšaldomos embrioniniame karvių serume su 10% dimetilsulfoksido. Užšaldymo režimas - 1°C/min. iki -70°C, po to lastelės perkeliamos į skystą azotą. Atšildymas - vandens vonioje 37°C. Lastelių gyvybingumas po atšildymo - 70-80%.

Kontaminacija. Bakterijų ir grybų kultūrose nerasta, mikoplazmos testas neigiamas.

Lastelių produktyvumas. 3-4 kultivavimo dieną MA sekrecijos lygis terpeje - 10-15 µg/ml, ascitiniame skystyje - 5-10 mg/ml, MA titras ascitiniame skystyje - 1:30000. MA produkcija išlieka iki 15 pasažų kultūroje ir iki 5 pasažų ascite.

Produktų charakteristika. Hibridomos GH-1 ir GH-2 produkuoja IgG klasės, IgG1 poklasio MA, specifiskus žmogaus augimo hormonui. Dviepitopinės analizės metodu buvo nustatyta, kad šie MA atpažįsta skirtingus epitopus (amino rūgščių sekas) žmogaus augimo hormono molekulėje.

Išradimą iliustruoja šie pavyzdžiai.

1 p a v y z d y s. Hibridomų gavimas. Linijos BALB/c pelės imunizuojamos rekombinantiniu žmogaus augimo hormonu, turinčiu pirmosios N-galinės amino rūgšties deleciją (dez-Phe-1-STH). Šis hormonas pagamintas Biotechnologijos institute "Fermentas". Pelės imunizuojamos, suleidžiant antigeną į pilvo ertmę. Pirmos 3 imunizacijos atliekamos kas 10 dienų, suleidžiant kiekvienai pelei po 100 µg augimo hormono, suspenduoto pilname Froindo adjuvante. Paskutinė imunizacija atliekama po 5 savaičių – likus 5, 3 ir 2 dienoms iki hibridizacijos, suleidžiama po 100 µg augimo hormono fiziologiniame tirpale.

Hibridizacijai naudojama pelių mielomos linija NSO/1 logaritminėje augimo fazėje ir imunizuotos pelės blužnies limfocitai. Hibridizacijos agentas – 50% polietilenglikolio (PEG-4000) tirpalas DMEM terpėje su 15% dimetilsulfoksido, mielomos ir blužnies ląstelių santykis hibridizacijos metu – 1:7. Hibridizacija vykdoma 1 min., po to ląstelės atplaunamos nuo PEG beserumine DMEM terpe, centrifuguojamos, suspenduojamos HAT terpėje ir išsėjamos į plokšteles, po 10^5 ląstelių į šulinėli. Prieš tai plokštelėse pasodinami makrofagai iš pelės pilvo ertmės. Hibridinių ląstelių selekcija atliekama HAT terpėje, kuri 7-tą kultivavimo dieną palaipsniui keičiama HT terpe (hipoksantinas, timidinas), o po to – normalia kultivavimo terpe su dviguba serumo koncentracija (20%). Hibridiniai producentai klonuojami dideliu praskiedimu metodu, išsėjant po 1 ląstelę į šulinėli. Atrinkti klonai padauginami ir toliau auginami pelių BALB/c pilvo ertmėje, kur formuojasi ascitas.

2 p a v y z d y s. MA specifiškumo tikrinimas netiesioginės IFA metodu. Teigiamų hibridų atrinkimui naudojamas netiesioginės imunofermentinės analizės (IFA) metodas. Plokštelėse sorbuojamas žmogaus augimo hormonas: į šulinėlius įpilama po 0,5 µg antigeno 100 µl 0,05 M Na-karbonatinio buferio (pH 9,5) ir inkubuojama 16 val. 4°C temperatūroje. Po to plokštelės šulinėliai blokuojami 1% albumino tirpalu, atplaunami vandeniu ir užpildomi 100 µl hibridų auginimo terpės. Po inkubacijos (1 val. kambario temperatūroje) ir atplovimo į šulinėlius įpilama po 100 µl triušio antikūnų prieš pelės imunoglobulinus, konjuguotų su krienų peroksidaze. Po inkubacijos (30 min. kambario temperatūroje) ir atplovimo

išryškinama fermentinė reakcija: i šulinėlius įpilama po 100 μ l o-fenilendiamino tirpalo (0,5 mg/ml) 0,05 M Na-acetatiniam buferyje (pH 5,5) su 0,03% vandenilio peroksido. Reakcija sustabdoma po 10-15 min., pridedant po 50 μ l 10% sieros rūgšties tirpalo. Optinis tankis matuojamas fotometru *Titertek Multiscan* ("Flow"), esant bangos ilgiui 492 nm. Šulinėliuose, kuriuose buvo hibridomų GH-1 ir GH-2 auginimo terpė, optinis tankis viršijo 2 opt. vnt., o tuose šulinėliuose, kuriuose buvo MA neprodukuojančių hibridų auginimo terpė - mažesnis nei 0,3 opt. vnt.

3 p a v y z d y s. MA specifiškumo tikrinimas dviepitopinės IFA metodu. Plokštelės šulinėliuose sorbuojami MA GH-1 (po 1 μ g i šulinėli). Po blokavimo ir atplovimo (žr. 2 pvz.) i šulinėlius įpilama po 100 μ l žmogaus augimo hormono tirpalo (20-200 ng/ml) fosfatiniam buferyje su 0,05% detergento *Tween-20*. Po inkubacijos (1 val. kambario temperatūroje) ir atplovimo pridedama po 100 μ l konjugato - MA GH-2, konjuguotų su krienų peroksidaze. Inkubuojama 1 val. kambario temperatūroje. Po to plokštelė atplaunama ir išryškinama fermentinė reakcija, kaip nurodyta aukščiau (žr. 2 pvz.). Šios analizės rezultatai parodė, kad MA GH-1 ir GH-2 reaguoja su skirtingais žmogaus augimo hormono epitopais, t.y. buvo stebima tiesioginė optinio tankio priklausomybė nuo antigeno koncentracijos. Naudojant tokioje analizės sistemoje vienodo specifiškumo arba konkuruojančius antikūnus (pvz., GH-1 su GH-1 konjugatu), augimo hormonas nereaguoja su konjugatu ir optinio tankio padidėjimo nestebima.

4 p a v y z d y s. Žmogaus augimo hormono nustatymas dviepitopinės IFA metodu. Analizė atliekama tokiu būdu, kaip aprašyta 3 pavyzdyje. Augimo hormono koncentracija tiriamuosiuose tirpaluose nustatoma pagal kalibracinę kreivę, kuri atspindi optinio tankio priklausomybę nuo hormono koncentracijos. Tiesinė priklausomybė stebima, esant hormono koncentracijai 5-100 ng/ml. Kalibracinei kreivei naudojamas standartinis augimo hormono tirpalas (1 μ g/ml), kuris atitinkamai atskiedžiamas. Metodo jautrumas - 10 ng/ml augimo hormono. Šiuo metodu buvo nustatyta, kad MA GH-1 ir GH-2 vienodai gerai reaguoja su rekombinantiniu ir natūraliu (išskirtu iš hipofizio) žmogaus augimo hormonu, bet nereaguoja su jaučio augimo hormonu. Metodas gali būti panaudotas technologinio proceso kontrolei, gaminant tiek rekombinantini,

tiek natūralų žmogaus augimo hormoną, o taip pat ir galutinio produkto analizei. Metodas gali būti pritaikytas ir medicininėje diagnostikoje – tais atvejais, kai augimo hormono koncentracija kraujo serume būna padidėjusi (virš 10 ng/ml).

Hibridomos GH-1 ir GH-2 skiriasi nuo anksčiau aprašyto analogo – hibridomos WMB 2/3 – pagal šiuos požymius: 1) hibridoma WMB 2/3 produkuoja antikūnus prieš jaučio augimo hormoną; 2) hibridoma WMB 2/3 gauta kitos mielominių ląstelių linijos – X-63 Ag8653 – pagrindu.

Hibridomos GH-1 ir GH-2 skiriasi nuo anksčiau aprašytu analogu – hibridomų A64-D/E3, A64-E/C8, A64-D/F2, A64-E/B12 pagal šiuos požymius: 1) minėtos hibridomos gautos, naudojant imunizacijai natūralų žmogaus augimo hormoną, 2) ląstelių hibridizacijai panaudotas sudėtingas elektrofuzijos metodas, 3) teigiamų hibridų atrinkimui panaudotas radioimuninis metodas, reikalaujantis ypatingų atsargumo priemonių, 4) hibridizacijai panaudota mielominių ląstelių linija X-63 Ag8653.

Hibridomų GH-1 ir GH-2 palyginimas su analogais apibendrintas 1 lentelėje.

1 lentelė.

Hibridomų, produkuojančių MA prieš augimo hormoną,
charakteristika

Hibridomos pavadinimas	Specifiškumas aug. hormonui	Imunogeno kilmė	Hibridizacijos būdas	Mieloma
WMB 2/3	jaučio	jaučio	PEG 1500	X-63Ag8653
A64-D/E3, A64-E/C8, A64-E/B12, A64-D/F2	žmogaus	žmogaus, natūralus	elektro- fuzija	X-63Ag8653
GH-1, GH-2	žmogaus	žmogaus, rekombin., dez-Phe-1	PEG 4000	NSO/1

I Š R A D I M O A P I B R Ė Ž T I S

Hibridomos, produkuojančios pelės monokloninius antikūnus prieš žmogaus augimo hormoną (deponuotos Biotechnologijos institute "Fermentas", deponavimo numeriai H 0304 ir H 0305).