



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **26764** (13) **U**
(51) МПК (2006)
C12N 5/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) МОНОКЛОНАЛЬНІ АНТИТІЛА ДО ІGM ЛЮДИНИ, ПРИДАТНІ ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ У ІМУНОФЕРМЕНТНИХ ТЕСТ-СИСТЕМАХ**

1

2

(21) u200704442

(22) 23.04.2007

(24) 10.10.2007

(46) 10.10.2007, Бюл. № 16, 2007 р.

(72) Ніколаєнко Ігор Васильович, Галкін Олександр
Юрійович(73) Ніколаєнко Ігор Васильович, Галкін Олександр
Юрійович(57) Моноклональні антитіла до IgM людини, при-
датні для використання у імуноферментних тест-

системах, належать до класу імуноглобулінів миші, продукуються гібридомами, які одержані внаслідок хімічно індукованої гібридизації імунокомпетентних В-лімфоцитів та мієломи Sp 2/0, які отримані за довгостроковою схемою імунізації мишей лінії BALB/c, характеризуються високими константою афінності, титром у культуральній рідині та титром пероксидазного кон'югату.

Корисна модель стосується імунохімії, гібридної технології та біотехнології і може бути використаний для одержання моноклональних анти-тіл (МКАТ) до імуноглобулінів людини класу IgM та їхніх імуноферментних кон'югатів. Метою корисної моделі є одержання нових моноклональних анти-тіл до IgM людини, придатних для використання у імуноферментних тест-системах.

Відомі МКАТ до імуноглобулінів людини класу IgM [1]. Проте згадані моноклональні антитіла непридатні для використання у імуноферментних тест-системах для серологічної діагностики.

Найбільш близьким до запропонованих є моноклональні антитіла, які взаємодіють із IgM людини [2].

У порівнянні із вищезгаданим антитілами кло-ни 43H3.2, 48B4.2, 45A2 характеризуються біль-шою специфічністю та активністю у імунофермен-тному аналізі.

Моноклональні антитіла продукуються гібрид-ними клітинами, що одержані при злитті мієломних мишачих клітин Sp 2/0 та спленоцитів мишей лінії Balb/c. Характеристики клонів МКАТ 43H3.2, 48B4.2, 45A2 наведені у таблиці 1. Клон МКАТ 43H3.2 придатний для використання у імунофер-ментних тест-системах у вигляді пероксидазного кон'югату, а клони МКАТ 48B4.2, 45A2 - у складі твердої фази.

Таблиця 1

Назва МКАТ	Ізотип ан- титіл	Константа афін- ності, $\times 10^{10}$ моль/л	Титр антитіл у культу- ральній рідині*	Титр пероксидазного кон'ю- гату МКАТ**
43H3.2	IgG ₁	1,4	1:1000	1:50000
45A2	IgG ₁	1,0	1:1000	—
48B4.2	IgG ₁	1,0	1:800	—

*тестування у непрямому твердофазному ІФА на IgM людини (сорбція 0,5мкг/мл)

**тестування у прямому твердофазному ІФА на IgM людини (сорбція 0,5мкг/мл)

Приклад 1. Одержання асцитичної рідини із
вмістом моноклональних антитіл

Черевину миші Balb/c обробляли спиртом та
внутрішньочеревно вводили по 0,5мл пристану

(Sigma, США, кат. номер T7640) за допомогою
стерильного скляного шприца на 1мл або 2мл;
використовували стерильні голки «Рекорд» 0,5x10-

(13) **U**
(11) **26764**
(19) **UA**

15мм. Мишей витримували 3-4 тижні. Процедуру праймування проводили у гумових рукавичках.

Кріопробірки з замороженими клітинами діставали з судини Дюара із рідким азотом, витримували на повітрі 2-3 хвилини та занурювали у воду із температурою 37-40°C. Пробірки витримували у воді до тих пір, поки повністю розтане лід. Після цього за допомогою піпетки на 1мл суспензії гібридом переносили у пробірки на 15мл (Nunc, кат. номер 366060), повільно додавали 10-15мл середовища DMEM (Sigma, США, кат. номер D 5648) без сироватки. Центрифугували при 1300об/хв. протягом 3хв. Надосад видаляли, а осад клітин ресуспендували у 10мл середовища DMEM (Sigma, США, кат. номер D 5648) без сироватки. Суспензію переносили у "пеніциліновий" флакон та закривали пробкою.

Суспензію клітин перемішували та набирали у стерильний шприц по 1мл, вводили у черевну порожнину мишей (справа або зліва від серединної лінії на 1см нижче від реберної дуги), яка за 3-4 тижні до цього була праймована пристаном. Мишей залишали на 5-10 днів для накопичення у черевній порожнині асцитичної рідини.

Дану процедуру проводили у гумових рукавичках.

Через 5-10 днів після введення мишам суспензії гібридом у очеревинних порожнинах спостерігалось накопичення асцитичних рідин. Для її відбору використовували трубку спеціальної голки довжиною 4см. Голки стерилізували шляхом обробки етиловим спиртом (70%) протягом 10хв. Черевину миші обробляли спиртом та робили голкою прокол справа або зліва від серединної лінії на 1см нижче від реберної дуги, відбирали асцитичну рідину у пробірку на 15мл (Nunc, кат. номер 366060). Після відбору рідини місце проколу обробляли спиртовим розчином йоду та на 1хв. затискали пінцетом. Повторний підбір асцитичної рідини проводили через 2-3 дні. Процедуру підбору асцитичної рідини проводили доти, доки тварина залишалася живою. У середньому одна миша здатна дати 2-5мл асцитичної рідини за один відбір. Асцитичну рідину центрифугували у пробірці на 15мл (Nunc, кат. номер 366060) при 5000об/хв. упродовж 5хв. Відбирали освітлену фракцію та зберігали у флаконах при мінус 20°C.

Процедуру відбору асцитичної рідини проводили у гумових рукавичках.

Приклад 2. Виділення та очистка моноклональних антитіл

Розморожували асцитичну рідину із вмістом моноклональних антитіл та переносили її у центрифужну пробірку на 15мл. Пробірку поміщали у нагріту до 37°C воду на 10 хвилин. Зважували сульфат натрію в кількості, потрібній для 18%-го насичення (вага на об'єм) асцитичної рідини, всипали у пробірку з асцитом та старанно струшували до розчинення сульфату натрію. Спостерігали помутніння, зумовлене випадінням в осад МКАТ. Пробірку центрифугували при 10000об/хв. упродовж 5 хвилин у кутовому роторі. Після чого надосад видаляли, а осад антитіл розводили у 5мл деіонізованої води. Пробірку поміщали у нагріту до 45-50°C воду на 5 хвилин.

Знову зважували сульфат натрію у кількості, потрібній для 16%-го насичення (вага на об'єм) розчину антитіл, всипали у пробірку та старанно струшували до розчинення сульфату натрію. Спостерігали помутніння, зумовлене випадінням антитіл в осад. Пробірку центрифугували при 10000об/хв. упродовж 5 хвилин у кутовому роторі. Після чого надосад видаляли, а осад антитіл розводили у 2-3мл деіонізованої води.

Одержаний розчин МКАТ фільтрували через фільтри з порами 0,22мкм.

Для переведення МКАТ у фосфатний буфер використовували 0,02М фосфатний буфер (рН 7,2-7,4) та колонку 1,5х20см з сефадексом G-25 зрівноважену фосфатним буфером. МКАТ, одержані раніше, в об'ємі 2-3мл наносили на гель, після поглинання розчину гелем наносили такий же об'єм буферу. Після поглинання гелем буферу колонку заповнювали фосфатним буфером доверху, вставляли адаптер та проводять елюцію фосфатним буфером із швидкістю 2мл/хв. Вихід піку реєстрували при 280нм. Збирали фракцію МКАТ в окремий флакон, додавали 1% 10%-ого азиду натрію та зберігали при плюс 4°C до 6 місяців.

Приклад 3. Спосіб одержання кон'югату моноклональних антитіл 43НЗ.2 з пероксидазою хрому

Кон'югацію МКАТ з пероксидазою хрому здійснювали у співвідношенні антитіл до ферменту 2:1 (масові долі) методом періодатного окислення за Tijssen [3] із власними модифікаціями.

При окисненні пероксидазу хрому розчиняли у 0,1М бікарбонатному буфері, до концентрації 15мг/мл та додавали такий же об'єм 14мМ водного розчину періодату натрію. Суміш інкубували протягом 2 годин при кімнатній температурі. Одержаний таким чином розчин активованої пероксидази додавали до розчину антитіл, які попередньо діалізували проти 0,1М карбонатного розчину, рН 9,2. Суміш переносили у герметичну хроматографічну колонку та додавали 1/3 частину сухого сефадексу G25, інкубували протягом 3 годин при кімнатній температурі.

По закінченні інкубації, розчин кон'югату елюювали з колонки та зупиняли реакцію додаванням 1/20 об'ємні частини водного розчину NaBH₄ (5мг/мл), залишаючи на 30хв. при кімнатній температурі. Після цього ще додавали 3/20 частини розчину боргідриду натрію, інкубували протягом 60хв. Одержаний розчин пероксидазного кон'югату МКАТ переводили у 0,02М фосфатний буфер з 0,15М NaCl шляхом діалізу.

Приклад 4. Використання кон'югату моноклональних антитіл 43НЗ.2 з пероксидазою хрому у тест-системі для діагностики цитомегаловірусної інфекції

У лунки імуносорбенту вносили розчин для розведення сироваток (90мкл) та досліджувані сироватки (10мкл) та інкубували при 37°C упродовж 60 хвилин та відмивали фосфатно-сольовим буфером з детергентом (ФСБД) 4 рази. Далі в лунки вносили по 100мкл розчину кон'югату моноклональних антитіл та інкубували при 37°C упродовж 30 хвилин. Далі в лунки вносили по 100мкл розчину хромогену - 3,3',5,5'-тетраметилбензидину - й інкубували при 18-25°C в темному місті протягом

30 хвилин, після чого реакцію зупиняли внесенням у всі лунки по 100мкл стоп-реагенту. Через 5 хвилин після зупинення реакції визначали оптичну густину при 450нм/620нм.

Приклад 5. Одержання імуносорбенту та використання моноклональних антитіл 48В4.2 та 45А2 у тест-системах для діагностики токсоплазмозу, червоних та герпетичної інфекції

Для одержання імуносорбенту сорбцію МКАТ у полістиролових планшетах проводили у 0,05М карбонат-бікарбонатном буфері (рН 9,6) протягом ночі при 4°C в концентрації 5мкг/мл. Для відмивання використовували фосфатно-сольовий буфер з детергентом (ФСБД), рН 7,2-7,4. У лунки готового імуносорбенту вносили досліджувані сироватки та розчин для їх розведення у співвідношеннях, що наведені у таблиці 2.

Таблиця 2

Призначення тест-системи	МКАТу імуносорбенті	Об'єм розчину для розведення сироваток	Об'єм досліджуваної сироватки
Виявлення антитіл класу IgM до збудника токсоплазмозу людини <i>Toxoplasma gondii</i>	48B4.2	90мкл	10мкл
Виявлення антитіл класу IgM до вірусу простого герпесу 1 і 2 типів	45A2		
Виявлення антитіл класу IgM до вірусу червонички	48B4.2	100мкл попередньо розведеної 1:51 сироватки	

Сироватки інкубували при 37°C упродовж 60 хвилин та відмивали ФСБД 4 рази. Далі в лунки вносили по 100мкл розчину кон'югату антигенів та інкубували при 37°C упродовж 30 хвилин. Далі в лунки вносили по 100мкл розчину хромогену - 3,3',5,5'-тетраметилбензидину - й інкубували при 18-25°C в темному місті протягом 30 хвилин, після чого реакцію зупиняли внесенням у всі лунки по 100мкл стоп-реагенту. Через 5 хвилин після зупинення реакції визначали оптичну густину при 450нм/620нм.

Приклад 6. Одержання гібридом (процедура гібридизації).

Тварину-донора імунокомпетентних лімфоцитів вибирали за результатами титрування сироваток мишей. Селезінку після забою миші стерильно видаляли, та м'яко гомогенізували в середовищі з 10% ембріональною телячою сироваткою (ЕТС). Для лізису еритроцитів селезінку клітини після центрифугування реруспендували в 0,83% розчині хлориду амонію. Спленоцити витримували 3хв. при 4°C і осаджували при 1500об/хв. 5хв. Потім ще раз відмивали середовищем без сироватки, ресуспендували в 15мл DMEM та підраховували кількість життєздатних клітин у камері Горяєва.

Таким чином одержували $(3-5) \times 10^8$ лімфоцитів із високою життєздатністю за результатами включення тріпанового синього. Їх змішували з мієломними клітинами у співвідношенні 2:1 і центрифугували при 1000об/хв протягом 12хв у пробірці ємністю 50мл. Середовище майже повністю вида-

ляли, а клітинний осад старанно розбивали, постукаючи пробіркою по столу ламінарного боксу. Потім у суспензію клітин вносили 1мл 40% розчину ПЕГ з 5% ДМСО.

Суміш клітин витримували в середовищі з ПЕГ 5хв при кімнатній температурі і центрифугували при 1000об/хв 2хв. Потім суспензію повільно розводили середовищем DMEM без сироватки до об'єму 50мл. До суспензії додавали 3мл ЕТС. Клітини після зливання осаджували при 1000об/хв 15хв. Надосад відсмоктували, а осад обережно ресуспендували у повному ростовому середовищі DMEM з 15% ЕТС і 50мкг/мл ампіциліну. Концентрацію клітин доводили до $(1-2) \times 10^6$ /мл і вносили в 96-лункові планшети по 100мкл на лунку.

Перелік літературних джерел:

1. Shao Z., Xu D., Li J. et al. Detection of anti-HAV antibody with dot immunoglobulin filtration assay // World J. Gastroenterol. - 2003. - Vol.9. - P.1508-1511.

2. Ramskill S., Senior P., Barlow P. et al. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for cytomegalovirus antibody in donor plasma // J. Clin. Pathol. - 1988. - Vol.41. - P.1233-1235.

3. Tijssen P. Preparation of enzyme-antibody or enzyme-macromolecule conjugates // Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: practice and theory of enzyme immunoassays / Editors R.H. Burdon, P.H. van Knippenberg. - Amsterdam: Elsevier, 1985. - P.221-241.