



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **26768** (13) **U**
(51) МПК (2006)
C12N 5/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**видається під
відповідальність
власника
патенту**(54) МОНОКЛОНАЛЬНІ АНТИТІЛА ДО IgG ЛЮДИНИ, ПРИДАТНІ ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ У ІМУНОФЕРМЕНТНИХ ТЕСТ-СИСТЕМАХ**

1

2

(21) u200704446

(22) 23.04.2007

(24) 10.10.2007

(72) НІКОЛАЄНКО ІГОР ВАСИЛЬОВИЧ, UA,
ГАЛКІН ОЛЕКСАНДР ЮРІЙОВИЧ, UA(73) НІКОЛАЄНКО ІГОР ВАСИЛЬОВИЧ, UA,
ГАЛКІН ОЛЕКСАНДР ЮРІЙОВИЧ, UA

(56)

(57) Моноклональні антитіла до IgG людини,
придатні 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 належить до імунохімії, гібридомної технології та біотехнології і може бути використаний для одержання моноклональних антитіл (МКАТ) до IgG людини та їхніх імуноферментних кон'югатів. Метою винаходу є одержання нових моноклональних антитіл до IgG людини, придатних для використання у імуноферментних тест-системах.

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

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

У порівнянні із вищезгаданим антитілами клони 153H11 та 156D11 характеризуються більшою специфічністю та активністю у імуноферментному аналізі. Моноклональні антитіла продукуються гібридними клітинами, що одержані при злитті мієломних мишачих клітин Sp 2/0 та спленоцитів мишей лінії Balb/c. Клоні МКАТ 153H11 та 156D11 характеризуються наступними ознаками (таблиця 1).

Назва МКАТ	Ізотип	Константа афінності, $\times 10^9$ моль/л	Титр антитіл у культуральній рідині	Титр пероксидазного кон'югату сироватки
153H11	IgG2b	11,0	1:500	1:200000

156D11	IgG,	5,0	1:1000
--------	------	-----	--------

тестування у непрямому твердофазному ІФА на IgG людини (сорбент)
** тестування у прямому твердофазному ІФА на IgG людини (сорбент)

Приклад 1. Одержання асцитичної рідини із вмістом моноклональних антитіл 153H11 та 156D11.

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» 0,5 \times 10-15мм. Мишей витримували 3-4 тижні. Процедуру праймування проводили у гумових рукавичках.

Кріопробірки з замороженими клітинами клонів 153H11 та 156D11 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 табуліну. 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

(13) **U**(11) **26768**(19) **UA**

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 пристанем. 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 суспензій пбридом 153H11 та 156D11 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 2-3дні. Процедуру підбору асциту проводили доти, доки тварина залишалася живою. У середньому одна миша здатна дати 2-5мл асциту 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 асциту проводили у гумових рукавичках.

Приклад 2. Виділення та очистка моноклональних антитіл 153H11

Розморожували асцитичну рідину та переносили її у центрифужну пробірку та освітлювали при 4000об/хв. протягом 30хв. Після цього асцитичну рідину фільтрували через фільтри з порами 0,45мкм (Sigma, США, кат. номер F8273).

Для афінної очистки використовували колонку з білком А-сефарозою об'ємом 10мл. Перед нанесенням асцитичної рідини колонку промивали із швидкістю 1,5-2мл/хв 5-10 об'ємами 0,02М натрій-калій фосфатного буферу, рН 7,0-7,2 (KH_2PO_4 та Na_2HPO_4). Фільтровану асцитичну рідину в об'ємі 20 мл пропускали через колонку зі швидкістю 1мл/хв. Після цього промивали колонку 10 - 15 об'ємами фосфатного буферу. Елюцію проводили за допомогою 0,1М лимонної кислоти в об'ємі 15мл. Вихід МКАТ 153H11 реєстрували при 280нм. Пік, який виходить із колонки збирали у флакон, що містив 2мл 1М трис основи. рН одержаного розчину мав становити 7,0 - 8,0, що контролювали за допомогою індикаторного паперу. Значення рН коректували додаванням кислоти або трис-основи. Після виходу піка колонку промивали із швидкістю 1,5-2мл/хв 10-20 об'ємами 0,02М натрій-калій фосфатного буферу до нейтрального рН.

МКАТ 153H11 концентрували за допомогою насиченого розчину сульфату амонію. Для цього до охолодженого препарату МКАТ 153H11 додавали насичений розчин сульфату амонію до 40-50% насичення. Витримували на холоді (4°C) 2-3 години, після чого центрифугували 20хв при 4000об/хв. при кімнатній температурі. Осад МКАТ ресуспендували в розчині сульфату амонію 40%-ого насичення та переносили у центрифужні пробірки на 15мл (Nunc, кат. номер 366060). Центрифугували у кутовому роторі при 10000об/хв. протягом 20хв. Надосад старанно видаляли, а осад МКАТ 153H11 розчиняли в мінімальній кількості (1-2мл) деіонізованої води. Розчин переносили у мікропробірки та освітлювали при 10000об/хв. протягом 10хв. Освітлені МКАТ 153H11 переносили до спільного флакону. Концентрація МКАТ 153H11, одержаних таким способом, коливається від 20 до 40мг/мл.

Одержаний розчин МКАТ 153H11 фільтрували через фільтри з порами 0,45мкм (Sigma, США, кат. номер F8273).

Стандартний фосфатний буфер (рН 7,2-7,4) фільтрували через фільтри з порами 0,45мкм (Sigma, США, кат. номер F8273). Використовували колонку 1,5 × 20см з сефадексом G-25 (Amersham Pharmacia Biotech, 17-0033-01) зрівноважену фосфатним буфером шляхом пропускання його із швидкістю 2мл/хв. протягом 20хв. МКАТ 153H11 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 проводили елюції фосфатним буфером із швидкістю 2 мл/хв. Вихід піку реєстрували при 280нм. Збирали фракцію МКАТ 153H11 в окремий флакон, додавали 1% 10%-ого азиду натрію та зберігали при плюс 4°C до 4 місяців.

Приклад 3. Виділення та очистка моноклональних антитіл 156D11

Розморожували асцитичну рідину із вмістом моноклональних антитіл 156D11 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 впродовж 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 впродовж 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 1,5 × 20см 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 4. Спосіб одержання кон'югату моноклональних антитіл 153Н11 та 156D11 з пероксидазою хрому.

Кон'югацію МКАТ з пероксидазою хрому здійснювали у співвідношенні антитіл до ферменту 2:1 (масові долі) методом періодатного окиснення 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 NaBI-L» (5мг/мл), залишаючи на 30хв. при кімнатній температурі. Після цього ще додавали 3/20 частини розчину боргидриду натрію, інкубували протягом 60 хв. Одержаний розчин пероксидазного кон'югату МКАТ переводили у 0,02М фосфатний буфер з 0,15М NaCl шляхом діалізу.

Приклад 5. Використання кон'югату моноклональних антитіл з пероксидазою хрому у тест-системах для діагностики гепатиту В, сифілісу, токсоплазмозу, простого герпесу.

У лунки імуносорбенту вносили досліджувані сироватки та розчин для їх розведення у співвідношеннях, що наведені у таблиці 2.

Якісне та напівкількісне визначення антитіл класу IgG до вірусу простого герпесу 1 і 2 типів	156D11	
--	--------	--

Планшет інкубували при 37°C упродовж 1 години та відмивали фосфатно-сольовим буфером з детергентом (ФСБД) 4 рази. Розчин кон'югату моноклональних антитіл вносили по 100мкл в лунку, інкубували при 37°C протягом 30 хвилин та відмивали ФСБД 6 разів. 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.

Перелік літературних джерел:

1. Климович В.Б., Самойлович М.П., Крутецкая И.Ю. и др. Моноклональные антитела к подклассам IgG человека: получение и исследование специфичности // Иммунология. - 1998. - №3. - С. 27 - 31.
2. Reimer C.B., Phillips D.J., Aloisio C.H. et al. Evaluation of thirty-one mouse monoclonal antibodies to human IgG epitopes // Hybridoma. - 1984. - Vol. 3, 3. - P. 263-275.
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.

Таблиця 2

Призначення тест-системи	МКАТ у кон'югаті	Об'єм розчину для розведення сироваток	Об'єм досліджуваної сироватки
Виявлення IgG-антитіл до корового білку вірусу гепатиту В	153Н11	80мкл	20мкл
Виявлення антитіл до збудника сифілісу <i>Treponema pallidum</i>	153Н11		
Кількісне визначення антитіл класу IgG до збудника токсоплазмозу людини <i>Toxoplasma gondii</i>	153Н11	100мкл попередньо розведеної 1:51 сироватки	