



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

240 846

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 02 04 84
(21) PV 2529-84

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 15/00

(40) Zveřejněno 16 07 85

(45) Vydáno 01 01 88

(75)
Autor vynálezu

HILBERT IVAN RNDr. CSc.;
KRIŠTOFOVÁ HANA RNDr.;
HOŘEJŠÍ VÁCLAV RNDr. CSc., PRAHA

(54)

Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS IN - 04

Řešení se týká myšího lymfocytárního hybridomu, produkujícího protilátku proti prasečímu a lidskému insulinu, uloženého ve sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV pod označením IN - 04. Samotná monoklonální protilátka hybridomu IN - 04 je vhodná pro použití v enzymo-imunologické a radioimunologické analýze a pro čištění insulinu afinitní chromatografií.

Vynález se týká nového hybridomu, tj. hybridního jednobuněčného organismu, sestrojeného fúzí buňky myší myelomové linie P3-X63-Ag8.653 a myší slezinné lymfoidní buňky, produkující protilátku proti prasečímu a lidskému insulinu.

Doposud se protilátky proti insulinu vyrábějí tak, že je insulin opakovaně injikován jako antigen pokusným zvířatům, nejčastěji morčatům. Sérum takto imunizovaných zvířat, odebírané po určité době působení antigenu, slouží jako zdroj protilátek, užívaných zejména pro kvantitativní stanovení plasmatického insulinu metodou radioimunologické analýzy. Tento postup, nazývaný konvenční imunizací, má několik nevýhod. V séru imunizovaných zvířat se nachází heterogenní směs protilátek, jejichž spektrum je v každém jednotlivém organismu různé a neopakovatelné. Organismus zpravidla vytvoří kromě protilátek vůči žádanému antigenu i protilátky proti nečistotám antigenního preparátu. Výrobní šarže konvenčních sér se proto dají těžko standardizovat a vycházejí z výroby v širokém rozmezí kvality. Pro výrobu každé šarže je třeba připravit čistý imunizační antigen a další antigeny pro vysycení balastních protilátek proti nečistotám.

Uvedené nedostatky výše zmíněného a dosud používaného postupu odpadnou, je-li k dispozici hybridom, produkující monoklonální protilátku proti insulinu, uložený ve Sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV v Praze 4, Vídeňská 1083, pod označením IMG CZAS IN-04.

Uvedený hybridom byl získán způsobem známým z odborné literatury (Fazekas de St. Groth, S., Scheidigger, D.: Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics, J.Immunol. Meth., 35:1-21, 1980; Galfré, G., Howe, S.C.,

Milstein, C., Butcher, G.W., Howard, J.C.: Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines, *Nature* 266:550, 1977) klonováním souboru hybridních buněk, vzniklých fúzí buněk myší myelomové linie P3-X63-Ag8.653 a buněk, získaných ze sleziny myší kmene BALB/c, imunizovaných prasečím insulinem.

Výhodou hybridomu je, že produkuje homogenní protilátku, tzv. protilátku monoklonální, která je schopna specificky reagovat s prasečím i lidským insulinem. Hybridom IN-04 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. Z konserv, uchovávaných v kapalném dusíku, je možné zahájit produkci protilátky bez dalšího antigenu. Protilátka, produkovaná hybridomem IN-04, reaguje jak s prasečím, tak lidským insulinem (tj. rozeznává determinantu společnou pro tyto dva velmi podobné peptidy) a není třeba se zbavovat protilátek balastních.

Příklad

Za účelem pomnožení hybridomových buněk in vivo bylo aplikováno 5×10^6 buněk do peritoneální dutiny myší. Aby došlo k lepšímu uchycení aplikovaných buněk, byla myš 14 dní před přenosem buněk hybridomu ovlivněna parafinovým olejem (0.5 ml intraperitoneálně). Po 20 dnech růstu hybridomu v peritoneální dutině byla myš zabita a naprodukováná ascitická tekutina odebrána. Celkem bylo získáno 2.0 ml ascitické tekutiny, která obsahovala 7 mg/ml imunoglobulinu. Protilátka reagovala se specifickým antigenem (lidským nebo prasečím insulinem) v enzymoimunologickém testu (při použití prasečí antimyší protilátky značené křenovou peroxidázou) až do ředění $1:10^7$. Po navázání protilátky na agarosový gel bylo možno na tomto imunosorbentu izolovat insulin metodou afinitní chromatografie.

Buňky hybridomu IN-04 mají ultrastrukturní obraz typických myelomových buněk. Buňky hybridomu obsahují jádra charakteristické značnou polymorfií. Cytoplasma buněk obsahuje velké množství polyribosomů, mitochondrie a slabě vyvinuté endoplasmatické retikulum. In vitro rostou jako polosuspenní kultury. Základním kultivačním médiem je Eaglovo minimální esenciální médium s Hanksovou solnou směsí doplněné o neesenciální aminokyseliny, L-glutamin (3 mM), pyruvát sodný (1 mM). Toto médium (označované jako H-MEMd, Ústav molekulární genetiky ČSAV) je pro kultivaci hybridomu IN-04 doplněno penicilinem, streptomycinem, gentamycinem, 2-merkaptetanolem (0.05 mM) pufrem HEPES (10 mM) a inaktivovaným bovinním sérem (Bioveta, Ivanovice na Hané, 10%). Hybridom je kultivován při 37°C. Střední generační čas je 21.5 hod. a 10 měsíců po seštrojení byl modální počet chromosomů 89. Produkovaná protilátka je monoklonální imunoglobulin podtřídy IgG1 s lehkými řetězci typu , její isoelektrický bod je v rozmezí pH 7.0 - 7.2.

Monoklonální protilátka, produkovaná hybridomem IN-04 reaguje specificky s prasečím a lidským insulinem.

Hybridom IN-04 může být průmyslově využíván jako zdroj monoklonální protilátky proti insulinu v metodách analytických nebo preparativních.

Monoklonální protilátka hybridomu IN-04 může být využita pro analytické stanovení insulinu při klinické diagnostice v zdravotnických zařízeních, zvláště endokrinologicky zaměřených. Imobilizované monoklonální protilátky může být použito k čištění insulinu pomocí afinitní chromatografie.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

240 848

Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS IN-04, produkující monoklonální protilátku podtřídy IgG1 proti prasečímu a lidskému insulinu.