



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

230 070

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlášené 13 05 82

(21) PV 3479-82

(51) Int. Cl.

A 61 K 39/42

C 12 N 5/00

(40) Zverejnené 25 11 83

(45) Vydané 01 04 86

(75)
Autor vynálezu

NOVÁK MICHAL MVDr. CSc.,
GREŠÍKOVÁ MILOTA MUDr.DrSc., člen korešpondent SAV.,
SEKEYOVÁ MAGDALÉNA phMr., STRMEŇOVÁ EMÍLIA,
RUSS GUSTÁV RNDr.CSc., ČIAMPOR FEDOR MUDr. CSc., BRATISLAVA,
POSPÍŠIL MILAN RNDr. CSc., PRAHA

(54)

Monoklonálna protilátka proti vírusu kliešťovej
encefalitídy a spôsob jej prípravy

Vynález sa týka spôsobu prípravy monoklonálnych protilátok. Podstatou vynálezu je, že pozostáva z imunochemicky a biologicky identických imunoglobulínových molekúl triedy M zložených z dvoch ľahkých reťazcov typu κ a dvoch ťažkých reťazcov izotypu μ , ktoré majú hemaglutinačno-inhibičnú aktivitu proti vírusu kliešťovej encefalitídy a ich príprava sa vyznačuje tým, že slezinové bunky myši imunizovanej kměnom vírusu kliešťovej encefalitídy IV SAS Cl.gl. 53 skalica sa spoja s S-azaguanín rezistentnými myšimi myelómovými bunkami a kultivujú sa v kompletnom živnom roztoku obohatenom I-glutamínom, 2-merkaptostanolom, normálnym konským sérom a antibiotikami, pričom vznikne za selektívneho tlaku aminopterínu nová hybridómová bunková línia, ktorá sa kľonuje v agare, tak, že sa mieša 1 % agar s 5 až 10×10^6 slezinovými bunkami a 2 x koncentrovaným médiom, na ktorý sa po zatuhnutí naniesie 100 hybridných buniek v 0,25 % agare, v ktorom po 10 až 14 dňoch vyrastú kolónie, ktoré po pomnožení v kultivačnom médiu nádorovo rastú v 2,6,10, 14-tetrametylpentadékanom s enzibilizovanej peritoneálnej dutine myši za súčasnej produkcie monoklonálnych protilátok o jednej špecifite proti hemaglutinínu vírusu kliešťovej encefalitídy o hemaglutinačno-inhibičnom titre 10256.

Vynález má využitie v medicíne.

vynález sa týka monoklonálnej protilátky proti vírusu kliešťovej encefalitídy a spôsobu jej prípravy.

základným predpokladom presnosti a úspešnosti imunologických postupov vo virológii je príprava protilátky o žiadanej špecificite. Pre prípravu špecifických protilátok sa využíval len jeden princíp - imunizácia zvierat antigénmi /v rôznych modifikáciach a kombináciach/. Množstvo, ako i kvalita na takomto princípe získaných protilátok veľmi závisí od dávky, formy antigénu a spôsobu jeho podania. Tieto ukazovatele sa menia nielen od jedného experimentálneho zvieratá k druhému, ale i od jedného odberu k druhému u toho istého jedinca. uvedené problémy boli preklenuté zavedením novej biotechnológie prípravy monoklonálnych protilátok, ktoré na rozdiel od konvenčne pripravených protilátok majú vyhradenú špecifičnosť a to z toho dôvodu, že sú imunochemicky a biologicky homogénnymi produktami cielene dosiahnutej bunkovej línie [G. Köhler, C. Milstein; Nature 256, 495, /1975/]. Pomocou tejto metodiky boli pripravené monoklonálne protilátky proti niektorým obaleným vírusom [R. C. Nowinski, M. R. Stone, M. R. Tam, M. E. Lostrom, W. N. Burnette, V. P. O'Donnel; Monoclonal Antibodies. Eds. R. H. Kennet, T. J. Kearn, K. B. Bechtol, Plenum Press, N. Y. 295, /1980/; H. Koprowski, T. Wiktor; Monoclonal Antibodies. Eds. R. H. Kennet, T. J. Kearn, K. B. Bechtol, Plenum Press N. Y. 317 /1980/; W. Gerhard, J. Yewdel, M. S. Frankel, A. D. Lopes, L. Staudt; Monoclonal Antibodies; Eds. R. H. Kennett, T. J. Kearn, K. B. Bechtol, Plenum Press N. Y. 335 /1980/].

v prípade prípravy špecifických protilátok proti vírusu kliešťovej encefalitídy vyššie spomenuté nedostatky odstraňuje vynález, ktorého podstata spočíva v tom, že sa pripravila monoklonálna protilátka s hemaglutinačno-inhibičnou aktivitou proti vírusu kliešťovej encefalitídy vyznačujúca sa tým, že pozostáva z imunochemicky a biologicky identických imunoglobulínových molekúl triedy M zložených z dvoch ľahkých reťazcov typu κ /kappa/ a dvoch ťažkých reťazcov izotypu μ /mí/, ktorých príprava sa v našom spôsobe realizuje tak, že slezinové bunky myši imunizovanej kmeňom vírusu kliešťovej encefalitídy skľica sa spoja s 8-azaguanín rezistentnými myšimi myelómovými bunkami a kultivujú sa v kompletnom živnom roztoku obohatenom L-glutamínom, 2-merkaptóetanolom, normálnym konským sérom a antibiotikami, pričom vznikne za selektívneho tlaku aminopterínu nová hybridomová bunková línia, ktorá sa klónuje v agare tak, že sa zmieša 1 % agar s $5 \cdot 10^6$ slezinovými bunkami a 2 x koncentrovaným médiom, na ktorý sa po zatuhnutí naniesie 100 hybridných buniek v 0,25 % agare, v ktorom po 10 až 14 dňoch vyrastú kolónie, ktoré po pomnožení v kultivačnom médiu nádorovo rastú v 2,6,10,14-tetrametylpentadekanom senzibilizovanej peritoneálnej dutine myši za súčasnej produkcie monoklonálnych protilátok o jednej špecifite proti hemaglutinínu vírusu kliešťovej encefalitídy o hemaglutinačno-inhibičnom titre 10256. Produkčný hybridom sa kultivuje pri 37° C. Jeho stredný generačný čas je 20,3 hod. a modálny počet chromozómov bol 85.

Význam vynálezu spočíva v tom, že sa pripravila hybridná bunková línia produkujúca monoklonálne IgM protilátky proti kmeňu skľica /vírus kliešťovej encefalitídy/, ktoré reagujú

špecificky v hemaglutinačno-inhibičnom teste a odstraňujú nevýhody konvenčných antisér.

výhoda predmetu vynálezu spočíva v tom, že produkčná hybridná bunková línia je "nesmrteľná" a produkt tejto hybridnej bunkovej línie - monoklonálna protilátka je fyzikálne-chemicky a biologicky homogénny. Monoklonálna protilátka umožňuje štandardizovať diagnostické testy kliešťovej encefalitídy vo všetkých laboratóriách. Monoklonálna protilátka sa môže využiť pri imunoadsorbčnej purifikácii vírusu kliešťovej encefalitídy a ako účinná pomôcka pri analýze štrukturálnych proteínov vírusu kliešťovej encefalitídy a je vhodná na prípravu monošpecifických antisér. Hemaglutinačno-inhibičná aktivita monoklonálnej protilátky ju predurčuje pre odkrývanie ohnisk kliešťovej encefalitídy.

Príklad 1

všetky bunky sa kultivujú v médiu RPMI 1640, ktoré je zložené /mg/ml/ z: dusičnan vápenatý. $4H_2O$ - 100,0, Glukóza - 2000,0, síran horečnatý. $7H_2O$ - 100,0, chlorid draselný - 400,0, stredný fosforečnan sodný. $7H_2O$ - 1512,0, kyslý fosforečnan sodný. H_2O - 0, chlorid sodný - 6000,0, L-arginín - 200,0, L-asparagín - 50,0, kyselina L-asparágová - 20,0, L-cystín - 50,0, kyselina L-glutámová - 20,0, L-glutamín - 300,0, glutation - 1,0, glycín - 10,0, L-histidín - 15,0, L-izoleucín - 50,0, L-leucín - 50,0, L-lyzín - 40,0, L-metionín - 15,0, L-fenylalanín - 15,0, L-prolín - 20,0, L-serín - 30,0, L-treonín - 20,0, L-tryptofán - 5,0, L-tyrozín - 20,0, L-valín - 20,0, D-biotín - 0,2, vitamín B_{12} - 0,005,

D-pantotenát vápenatý - 0,250, cholínchlorid - 3,0, kyselina listová - 1,0, i-inozitol - 35,0, nikotínamid - 1,0, kyselina p-aminobenzoová - 1,0, pyridoxín-HCl - 1,0, riboflavín - 0,2, tiamín HCl - 1,0, fenolová červená - 5,0, kyslý uhličitán sodný - 2000,0 a doplnené s 2 mmol L-glutamín 5×10^{-5} mol 2-merkaptoetanolu, 100 ug/ml streptomycínu, 100 jednotiek/ml penicilínu, 10 % normálneho konského séra, 1 mmol Hepes /N-2-hydroxyetylpiiperazín-N'-2-etan sulfónová kyselina. Pre prípravu hybridnej bunkovej línie sa použije ako nositeľ nekonečnej proliferácie schopnosti myšia 8-azaguanín rezistentná myelómová línia, ktorá sa pomocou polyetylglykolu spojí s donormom špecifickej informácie - slezinovou lymfoidnou bunkou imunizovanej myši. Myši sa imunizujú vírusom kliešťovej encefalitídy /kmeň skalica, ktorý je uložený v čs. zbierke arbovirusov virologického ústavu SAV v Bratislave pod číslom IV SAS Cl.gl.53 skalica/ pomnoženom na kuracích embryonálnych bunkách. vírus sa purifikuje diferenciálnou centrifugáciou. primárna dávka vírusu sa aplikuje myšiam intraperitoneálne v množstve 0,2 ml /5120 HA jednotiek/. sekundárna dávka sa aplikuje po 35 dňoch intravenózne v objeme 0,2 ml /320 hemaglutinačných jednotiek/. v priebehu 14 dní vyrastú pod selektívnym tlakom aminopterínu hybridné bunkové línie, ktoré produkujú monoklonálne protilátky proti hemaglutinínu vírusu kliešťovej encefalitídy. tieto bunky sa potom klónujú tak, že sa zmieša $5-10 \times 10^6$ myších slezinových buniek s médiom a agarom /0,5 %/. Po zatuhnutí sa na vrstvu 0,5 % agaru naniesie 100 hybridných buniek v 0,25 % agare. Po 10 až 14 dňoch vyrastú kolónie, ktoré sa pomnožia v médiu RPMI 1640. Takto pomnožené kolónie predstavujú hybridomovú bunkovú líniu s upevnenou produkčnou schopnosťou

monoklonálnych protilátok. Ďalej sa nechajú rásť len tie hybridné bunkové klóny, ktoré ~~p~~roliferujú ako in vitro tak aj in vivo v peritoneálnej dutine histokompatibilných myší /inbredná línia BALB/c/, za súčasnej produkcie monoklonálnych protilátok v ascitických tekutinách až do výšky hemaglutinačno-inhibičného titru 10256.

PREDMET VYNÁLEZU

230 070

1. Monoklonálna protilátka s hemaglutinačno-inhibičnou aktivitou proti vírusu kliešťovej encefalitídy vyznačujúca sa tým, že pozostáva z imunochemicky a biologicky identických imunoglobulínových molekúl triedy M zložených z dvoch ľahkých reťazcov typu k /kappa/ a dvoch ťažkých reťazcov izotypu μ /mí/.
2. spôsob prípravy monoklonálnej protilátky s hemaglutinačno-inhibičnou aktivitou proti vírusu kliešťovej encefalitídy vyznačuje sa tým, že slezinové bunky myši imunizovanej kmeňom vírusu kliešťovej encefalitídy IV SAS cl.gl. 53 skalica sa spoja s 8-azaguanín rezistentnými myšimi myelómovými bunkami a kultivujú sa v kompletnom živnom roztoku obohatenom L-glutamínom, 2-merkaptóetanolom, normálnym konským sérom a antibiotikami, pričom vznikne za selektívneho tlaku aminopterínu nová hybridná bunková línia, ktorá sa klónuje v agare tak, že sa zmieša 1 % agar s 5 až 10×10^6 slezinovými bunkami a 2 x koncentrovaným médiom, na ktorý sa po zatuhnutí naniesie 100 hybridných buniek v 0,25 % agare, v ktorom po 10 až 14 dňoch vyrastú kolónie, ktoré po pomnožení v kultivačnom médiu nádorovo rastú v 2,6,10,14-tetrametyl-pentadekanom senzibilizovanej peritoneálnej dutine myši za súčasnej produkcie monoklonálnych protilátok o jednej špecificite proti hemaglutinínu vírusu kliešťovej encefalitídy a hemaglutinačno-inhibičnom titre 10256.