



ÚRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

230288

(11)

(B1)

[22] Prihlásené 10 11 82
[21] (PV 7991-82)

[40] Zverejnené 25 11 83

[45] Vydané 15 10 86

(51) Int. Cl.³
A 61 K 39/42//
C 12 R 1/445

(75)

Autor vynálezu

GREŠÍKOVÁ MILOTA MUDr. DrSc. člen korešpondent SAV,
NOVÁK MICHAL MVDr. CSc., SEKEYOVÁ MAGDALÉNA PhMr.,
BIELIKOVÁ VALÉRIA, BRATISLAVA

(54) Spôsob prípravy monoklonálnych protilátok

1

Vynález rieši spôsob prípravy monoklonálnych protilátok ku klieštovej encefalitíde.

Prvé monoklonálne protilátky boli pripravené v roku 1975 [O. Kohler, C. Milstein: Nature 256, 495, [1975]]. Pri príprave hybridómov ku klieštovej encefalitíde (fúzia myelomových buniek so slezinovými bunkami imunizovaného zvierata pomocou polyetylén glykolu) sa získavajú klóny, ktoré produkujú protilátky. Po reklónovaní buniek sa finálna propagácia robí v peritoneálnej dutine histokompatibilných zvierat, ktorým sa aplikuje Freundovo adjuvans, resp. Pristane (2, 6, 10, 14 — tetramethylpentadecane, Koch Light Lab. Ltd. Anglia) za účelom vytvorenia ascitickej tekutiny [M. Novák, M. Grešíková, M. Sekeyová, G. Russ, J. Zikán, M. Pospíšil, F. Čiampor: Acta virol., [1983]].

Podstata vynálezu spočíva v spôsobe prípravy monoklonálnych protilátok, ktorá sa vyznačuje tým, že do peritoneálnej dutiny imbrednej línie myši sa podá inaktivovaný *Staphylococcus aureus*, ktorý sa inokuluje do ústojného bujonu, inkubuje sa po dobu 18 hodín pri teplote 37 °C a potom sa inaktivuje pri teplote 60 °C po dobu 30 minút, udržiava sa po dobu 18 hodín pri teplote 4 °C; materiál sa opäť teplom inaktivuje, scen-

2

fuguje sa a v pokusoch sa používa sediment.

Výhoda navrhovaného spôsobu prípravy monoklonálnych protilátok proti klieštovej encefalitíde je, že protilátky špecificky reagujú v hemaglutinačno-inhibičnom teste. Získané monoklonálne protilátky umožňujú oddiferencovať vírus klieštovej encefalitídy od vírusov čeľade Togaviridae. Vynález umožňuje kultiváciu hybridómových buniek v peritoneálnej dutine histokompatibilných myši. Výhoda tejto metódy spočíva aj vo vysokej koncentrácii monoklonálnych protilátok.

Príklad

Inokuluje sa 1000 ml ústojného bujonu so *Staphylococcus aureus*; inkubuje sa infikovaný bujon po dobu 18 hodín pri teplote 37 °C. Po inaktivácii *Staphylococcus aureus* pri teplote 60 °C po dobu 30 minút sa nechá stáť po dobu 18 hodín pri 4 °C. Opätovne sa inaktivuje pri 60 °C po dobu 30 minút. Po centrifugácii sa získa 2 g sedimentu. Sediment sa resuspenduje v 30 ml bujonu. 1 mililiter preparátu obsahuje 60 000 000 buniek. Imbredná línia myši BALB/C sa používa v pokusoch. Myšiam sa podá 1,5 ml inaktivovaného *Staphylococcus aureus* 54 dní

pred imunizáciou. Myši sa imunizujú vírusom klieštovej encefalitídy, kmeňom Skalica, ktorý je uložený v Čs. zbierke arbovírusov Virologického ústavu SAV v Bratislave pod označením Clgl a číslom 53 Skalica, pomnoženom na kuracích embryonálnych bunkách a purifikovanom diferenciálnou centrifugáciou. Prvá dávka vírusu, podaná intraperitoneálne obsahuje 5120 hemaglutinačných jednotiek; druhá dávka podaná po 35 dňoch obsahuje 320 hemaglutinačných jednotiek. Hybridómové línie (myelómová línia P₃NSI/1 Ag 4-1) a slezinové lymfoidné bunky, ktoré produkujú monoklonálne protilátky in vitro sa zisťujú pomocou hemaglutinačno-inhibičného testu s antigénom klieštovej encefalitídy, kmeň Skalica. Po klónovaní a reklónovaní sa získajú hybridómové línie s trvalou schopnosťou produkovať monoklonálne protilátky. Ďalej sa udržiujú len tie, ktoré sú schopné produkovať monoklonálne protilátky. V snahe získať veľké kvantum monoklonálnych protilátok, myelómové hybridné bunky sa aplikujú BALB/C myšiam, ktorým sa 54 dní vopred podá inaktivovaný *Staphylococcus pyogenes aureus*. Ascii-

tická tekutina, obsahujúca monoklonálne protilátky má hemaglutinačno-inhibičný titer 1:162.240 u klónu č. 9 a 1:80 u klónu č. 16 (Tabuľka 1). Pripravené monoklonálne protilátky sa vyznačujú tým, že obsahujú identické imunoglobulíny triedy M (včasnú protilátku), ktorých izotyp ťažkého refazca je μ a typ ľahkého refazca je κ . Neutralizačný index po pridaní anti IgM protilátok bol 2,4 u klónu č. 9 a 2,1 u klónu č. 16.

Monoklonálne protilátky majú veľký význam v zdravotníckej diagnostike i v základnom výskume. Umožňuje sa štandardizácia produktu a diferenciálna diagnostika.

Tabuľka 1

Výsledky hemaglutinačno-inhibičného a neutralizačného testu s monoklonálnymi protilátkami ku klieštovej encefalitíde, pripravenými v ascitickej tekutine BALB/C myši za použitia

inaktivovaných *Staphylococcus aureus*

Klón číslo	Titer hemaglutinačno-inhibičných protilátok s antigénom		Neutralizačný index monoklonálnych protilátok
	Protilátky opracované acetónom	Protilátky opracované acetónom a 2-merkaptotoethanolom	
9	162.240	0	2,4
16	80	10	2,1

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob prípravy monoklonálnych protilátok vyznačujúci sa tým, že do peritoneálnej dutiny imbreďnej línie myši sa podá inaktivovaný *Staphylococcus aureus*, ktorý sa inokuluje do ústojného bujonu, inkubuje sa po dobu 18 hodín pri teplote 37 °C, potom

sa inaktivuje pri teplote 60 °C po dobu 30 minút, udržiava sa po dobu 18 hodín pri teplote 4 °C, materiál sa opäť inaktivuje teplom, sцентрифугује sa a v pokusoch sa používa sediment.