



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

259231

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 5/00

(22) Prihlášené 04 03 86

(21) PV 1486-86.H

(40) Zverejnené 15 02 88

(45) Vydané 15 03 89

(75)
Autor vynálezu

NOVÁK MICHAL MVDr. CSc., BORECKÝ LADISLAV akademik, BRATISLAVA,
TÁBORSKÝ OTTO RNDr. CSc., PRAHA, ŠUJANOVÁ ZDENKA RNDr., BRATISLAVA,
POSPÍŠIL MILAN RNDr. CSc., PRAHA

(54) Myší lymfocytárny hybridóm produkujúci monoklonálnu protilátku
inhibujúcu hemaglutinačnú aktivitu vírusu Newcastlekej choroby

Účelom riešenia je príprava izotypovo
a idiotypovo homogénnej protilátky o vysokej
čistote. Uvedeného účelu sa dosiahne použitím
myšieho lymfocytárneho hybridómu NDV-NTP-3,
produkujúceho monoklonálnu protilátku
inhibujúcu hemaglutinačnú aktivitu vírusu
Newcastleskej choroby. Myší lymfocytárny
hybridóm má použitie vo veterinárnej
medicíne.

Vynález sa týka myšieho lymfocytárneho hybridómu produkujúceho monoklonálne protilátky proti vírusu Newcastleskej choroby s hemaglutinačnou inhibičnou aktivitou.

Doposiaľ sa protilátky proti vírusu Newcastleskej choroby pripravujú tak, že sa vírus injikuje pokusným zvieratám, najmä králikom a ovciam. Vzhľadom na to, že nestačí jedna dávka vírusu pre vyvolanie dostatočne vysokej protilátkovej odpovede, je potrebné ho injikovať viackrát opakovane v rôznych dávkach a časových intervaloch. Sérum takto imunizovaných zvierat slúži ako zdroj protilátok najmä pri diagnostickom vyšetrení chovov hydiny. Zmiený postup imunizácie má niekoľko nevýhod.

Získava sa heterogénna zmes protilátok, ktorej rozloženie sa v organizme producenta mení, je veľmi rôznorodé, kvalitatívne a kvantitatívne kolíše od jedného odberu po druhý a je neopakovateľné. Okrem toho sérum obsahuje veľa protilátok proti nežiadúcim prísadám, ktoré sa nachádzajú vo vírusovom materiáli použitom pre imunizáciu. V dôsledku toho je potrebné séra upravovať zložitými postupmi, čím získavame heterogénne a neštandardné preparáty.

Využitelnosť takto pripraveného diagnostického séra je znížená aj tým, že jeho špecifické polyklonálne protilátky sú z hľadiska interakcie s vírusom veľmi rôznorodé. Navyše príprava vírusu pre imunizačné účely je nákladná.

Hybridóm NDV-NTP-3 bol pripravený známym spôsobom, klónovaním skupiny hybridómov v mäkkom agare, vzniklých fúziou buniek myšej 2-amino-6-hydroxy-8-azapurín /8-azaguanín/ rezistentnej myelómovej línie označenej NSO a slezinových buniek inbrednej línie myši BALB/c, imunizovaných purifikovaným vírusom NDV, kmeň L Kansas /G. Köhler, C. Milstein, G. W. Butcher, J. C. Howard: Nature 286, 550 /1977//.

Uvedené nevýhody v podstatnej miere odstraňuje vynález, ktorého podstata spočíva v myšom lymfocytárnom hybridóme NDV-NTP-3, produkujúcom monoklonálnu protilátku podtriedy IgG1, kappa, inhibujúcu hemaglutinačnú aktivitu vírusu Newcastleskej choroby.

Výhodou hybridómu je, že produkuje izotypovo a idiotypovo homogénnu špecifickú protilátku, tzv. monoklonálnu protilátku, ktorá špecificky inhibuje hemaglutinačnú aktivitu vírusu Newcastleskej choroby a tým je ho možné použiť na jeho identifikáciu vo vyšetrovaných vzorkách z rôznych chovov hydiny. Jednobunkový lymfocytárny hybridóm NDV-NTP-3 rastie in vivo v peritoneálnej dutine BALB/c myši za súčasnej tvorby ascites. Rastie aj in vitro v kultivačných médiách vhodných pre živočíšne bunky.

Taktiež pozmrazení a uložení v tekutom dusíku a po opätovnom rozmrazení si zachováva svoju schopnosť produkovať monoklonálnu protilátku viažucu vírus Newcastleskej choroby. Neobsahuje na rozdiel od konvenčných antisér nevhodné, balastné protilátky.

P r í k l a d 1

Pre prípravu hybridnej bunkovej línie sa použije $2 \cdot 10^7$ buniek myšej 2-amino-6-hydroxy-8-azapurín (8-azaguanín/ rezistentnej myelómovej bunkovej línie, ktoré sa pomocou 1 ml 50 % hmot. polyetylén glykolu spoja s $1 \cdot 10^8$ slezinových lymfocytárných buniek myši imunizovanej 10 µg vírusu. V priebehu 14 dní vyrastú pod selektívnym tlakom kyseliny 4-amino-pteroyl-glutámovej /aminopterínu/ hybridné bunkové línie, ktoré produkujú monoklonálne protilátky proti vírusu Newcastleskej choroby, ktoré sa s ním viažu a ovplyvňujú jeho biologickú aktivitu. Tieto bunky potom klónujú tak, že sa zmieša 0,5 % hmot. agaru s $5 \cdot 10^6$ až $10 \cdot 10^6$ myších slezinových buniek v médiu RPMI 1 640, ktoré obsahuje 100 mg.ml⁻¹ tetrahydrátu dusičnanu vápenatého, 2 000 mg.ml⁻¹ D-glukózy, 100 mg.ml⁻¹ heptahydrátu síranu horečnatého, 400 mg.ml⁻¹ chloridu draselného, 1 512 mg.ml⁻¹ hydrogenfosforečnanu sodného, 6 000 mg.ml⁻¹ monohydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného, 100 mg.ml⁻¹ kyseliny 2-amino-5-guanidínovalérovej /arginínu/, 50 mg.ml⁻¹ kyseliny 2-aminosukcínamovej /asparagínu/, 20 mg.ml⁻¹ kyseliny 2-aminojantárovej /kyseliny asparágovej/, 50 mg.ml⁻¹ kyseliny 3',3"-ditiobis/2-aminopropánovej / /cystínu/,

20 mg.ml⁻¹ kyseliny 2-aminoglutárovej /kyseliny glutamovej/, 300 mg.ml⁻¹ kyseliny 2-amino-glutarárovej /glutamínu/, 1 mg.ml⁻¹ kyseliny 2-aminoglutaraminyl-2-merkaptopropionyl-amino-octovej /glutathionu tj. glutaminyl-cysteinyl-glycínu/, 10 mg.ml⁻¹ kyseliny aminooctovej /glycínu/, 15 mg.ml⁻¹ kyseliny alfa-amino-1-imidazol-4-propiónovej /histidínu/, 50 mg.ml⁻¹ kyseliny 2-amino-3-metylvalérovej /izoluecínu/, 50 mg.ml⁻¹ kyseliny 2-amino-4-metylvalérovej /leucínu/, 40 mg.ml⁻¹ kyseliny 2,6-diaminohexánovej /lyzínu/, 15 mg.ml⁻¹ kyseliny 2-amino-4-/metyltio/-maslovej /metionínu/, 15 mg.ml⁻¹ kyseliny 2-amino-3-fenylpropiónovej /fenyl-alanínu/, 20 mg.ml⁻¹ kyseliny 2-pyrolidínkarboxylovej /prolínu/, 30 mg.ml⁻¹ kyseliny 2-amino-3-hydroxypropiónovej /serínu/, 20 mg.ml⁻¹ kyseliny 2-amino-3-hydroxymaslovej /treonínu/, 5 mg.ml⁻¹ kyseliny 2-amino-3-/3-indolyl/propiónovej /tryptofánu/, 20 mg.ml⁻¹ kyseliny 2-amino-3-/4-hydroxyfenyl/-propiónovej /tyrozínu/, 20 mg.ml⁻¹ kyseliny 2-amino-3-metylmaslovej /valínu/, 0,2 mg.ml⁻¹ kyseliny 5-/2-oxoimidazolidín-4,5-c/tiol-2-yl/pentánovej /biotínu/, 0,005 mg.ml⁻¹ kobalt alfa/alfa-/5,6-dimetylbenzimidazolyl/-kobalt-beta-kyanokobamid vitamínu B₁₂/, 0,250 mg.ml⁻¹ D-N-/2,4-dihydroxy-3,3-dimetylbutyryl/-beta-2-aminopropionát vápenatý /pantotenát vápenatý/, 3 mg.ml⁻¹ 2-hydroxyetyltrimetylamóniumchlorid /cholínchlorid/, 1 mg.ml⁻¹ kyseliny N-/2-amino-4-hydroxypteridín-6-ylmetyl/-p-aminobenzoovej /kyseliny listovej/, 35 mg.ml⁻¹ /1,2,3,5/4,6/cyklohexándexol/ /myoinozitolu/, 1 mg.ml⁻¹ pyridín-3-karboxyamidu /nikotínamidu/, 1 mg.ml⁻¹ kyseliny 4-aminobenzoovej /kyseliny p-aminobenzoovej/, 1 mg.ml⁻¹ 3-hydroxy-4,5-bis/hydroxymetyl/-2-metylpyridínchloridu /pyridoxínchloridu/, 0,2 mg.ml⁻¹ 7,8-dimetyl-10-/1^D-ribityl/izoxaloxazínu /riboflavínu/, 1 mg.ml⁻¹ 3-/4-amino-2-metyl-pyrimidyl-5-metyl/-5-/2-hydroxyetyl/-4-metyltiazolu /tiamínchloridu/, 2 000 mg.ml⁻¹ hydrogenuhlčitanu sodného doplnenom s 2 mmol kyseliny 2-aminoglutarárovej /glutamínu/, 5.10⁻⁵ mol 2-merkaptopetanolu, 100 µg.ml⁻¹ O-alfa-L-2-deoxy-2-/metylamo/-glukopyranozyl-/1-2/-O-alfa-L-deoxy-3-C-formyllyxofuranozyl-/1-4/-1,3-deoxy-1,3-diguanidoscyloinozitsulfátu /streptomycín-sulfátu/, 100 jednotiek na mililiter kyseliny 6-/N-fenylacetoamido/-penicilánovej /penicilínu G/, 1 mmol kyseliny N-2-hydroxyetyl-piperazín-N⁻-2-etán sulfónovej /Hepesu/ sa rozpustí v trikrát redestilovanej vode a doplní trikrát redestilovanou vodou na objem 900 ml roztoku, ktorý sa doplní 100 ml normálneho inaktivovaného konského séra.

Výsledné pH takto pripravovaného kultivačného média je 7,2. Po zatuhnutí agaru sa na vrstvu 0,5 % hmot. agaru nanesie 100 hybridných buniek v 0,25 % hmot. agaru. Po 10 dňoch vyrastú kolónie, ktoré sa pomnožia v médiu RPMI 1 640 doplnenom s 2 mmol kyseliny 2-aminoglutarárovej /glutamínu/, 5.10⁻⁵ mol 2-merkaptopetanolu, 100 µg.ml⁻¹ O-alfa-L-2-deoxy-2-/metylamo/-glukopyranozyl-/1-2/-O-alfa-L-deoxy-3-C-formyllyxofuranozyl-/1-4/-1,3-deoxy-1,3-diguanidoscyloinozitsulfátu /streptomycínsulfátu/, 100 jednotiek na mililiter kyseliny 6-/N-fenylacetoamido/-penicilánovej /penicilínu G/, 1 mmol kyseliny N-2-hydroxyetyl-piperazín-N⁻-2-etánsulfónovej /Hepesu/ sa rozpustí v trikrát redestilovanej vode a doplní trikrát redestilovanou vodou na objem 900 ml roztoku, ktorý sa doplní 100 ml normálneho inaktivovaného konského séra.

Výsledné pH takto pripraveného kultivačného média je 7,2. V 1 ml kultivačného média sa nachádza 350 až 700 tisíc hybridómov NDV-NTP-3 produkujúcich 10 až 100 µg monoklonálnej IgG1, kappa, protilátky.

P r í k l a d 2

Postupuje sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že sa v kultivačnom médiu použije nepredtestované bežné telacie fetálne sérum. Do takto pripraveného kultivačného prostredia prenesené bunky po fúzii nie sú schopné rásť a produkovať monoklonálne protilátky.

Myší lymfocytárny hybridóm NDV-NTP-3 sa kultivuje pri teplote 37 °C. Stredný generačný čas je 22,4 h, modálny počet chromozómov je 24 mesiacov po fúzii 70 chromozómov. Produkovaná monoklonálna protilátka je myší imunoglobulín triedy IgG1, kappa.

Monoklonálna protilátka produkovaná myším lymfocytárnym hybridómom NDV-NTP-3 môže byť použitá vo veterinárnej praxi pre zisťovanie vírusu Newcastleovej choroby v chovoch hydiny.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Myší lymfocytárny hybridóm NDV-NTP-3; produkujúci monoklonálnu protilátku inhibujúcu hemaglutinačnú aktivitu vírusu Newcastleskej choroby, podtriedy IgG1 kappa.