



ÚRAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

261508  
(11) (E1)

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>  
C 12 N 5/00

[22] Prihlášené 04 03 86

[21] (PV 1488-86.L)

[40] Zverejnené 15 67 88

[45] Vydané 15 05 89

[73]

Autor vynálezu

NOVÁK MICHAL MVDr. CSc., BRATISLAVA, TÁBORSKÝ OTTO RNDr. CSc.,  
POSPÍŠIL MILAN RNDr. CSc., PRAHA, KONTSEK PETER RNDr. CSc.,  
SENEC

[54] Myší lymfocytárny hybridóm produkujúci monoklonálnu protilátku pro  
špecifickému nádorovému antigénu bunkovej línie MSB1

1

2

Účelom riešenia je príprava izotypovo a idiotypovo homogénnej protilátky o vysokej čistote. Uvedeného účelu sa dosiahne použitím myšieho lymfocytárneho hybridómu MSB—NTP—1, produkujúceho monoklonálnu protilátku rozpoznávajúcu špecifický nádorový antigén lymfoblastoidnej bunkovej línie, označenej skratkou MSB1. Myší lymfocytárny hybridóm má použitie vo veterinárnej medicíne.

Vynález sa týka myšieho lymfocytárneho hybridómu produkujúceho monoklonálnu protilátku, rozpoznávajúcu špecifický nádorový antigén lymfoblastoidnej bunkovej línie označenej skratkou MSB1.

Doposiaľ sa protilátky proti lymfoblastoidnej bunkovej línii MSB1, ktorá nesie na svojom povrchu diagnostický antigén „MATS-A“ pripravovali tak, že sa pokusným zvieratám (králik, ovca) aplikovali živé MSB1 bunky. Vzhľadom na to, že nestačí jedna dávka buniek pre vyvolanie dostatočne vysokej protilátkovej odpovede, je potrebné ich injikovať viackrát opakovane v rôznych dávkach a časových intervaloch. Sérum takto imunizovaných zvierat slúži ako zdroj protilátok, najmä pri diagnostickom vyšetrení chovov hydiny. Zmienенý postup imunizácie má niekoľko nevýhod. Získava sa heterogénna zmes protilátok, ktorých 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 hlavne nežiadúce protilátky proti povrchovým antigénom, ktoré sa vyskytujú aj na normálnych bunkách.

V dôsledku toho je potrebné séra upravovať zložitými postupmi vysýtenia pomocou normálnych slezinových buniek tak, aby sérum obsahovalo protilátky len proti špecifickému nádorovému antigénu. Touto úpravou dochádza k veľkým stratám na sére a výraznému zníženiu titra špecifických protilátok. Pochopiteľne proces vysýtenia nie je možné štandardizovať, v dôsledku čoho sa i tak vysoká heterogenita konvenčných sér ešte prehĺbi. Okrem toho využiteľnosť takto pripravených diagnostických sér je znížená aj tým, že ich špecifické polyklonálne protilátky sú z hľadiska interakcie s povrchovými bunkovými antigénmi veľmi rôznorodé. Navyše príprava dostatočného množstva lymfoblastoidných buniek MSB1 pre imunizačné účely je náročná na technické vybavenie pracoviska, kvalifikovaný personál a finančné prostriedky.

Hybridóm MSB-NTP-1 bol pripravený známym spôsobom, klónovaním skupiny hybridómov v mäkkom agaru, vzniklých fúziou buniek myšej 2-amíno-hydroxy-8-azapurín (8-azaguanín) rezistentnej myelómovej línie označenej NSO a slezinových buniek inbrednej línie myši BALB/c, imunizovaných lymfoblastoidnou bunkovou líniou MSB1 [G. Köhler, C. Milstein, G. W. Butecher, J. C. Howard: Nature 286, 550 (1977)].

Uvedené nevýhody v podstatnej miere odstraňuje vynález, ktorého podstata spočíva v myšom lymfocytárnom hybridóme MSB-NTP-1, produkujúcom monoklonálnu protilátku podtriedy IgG1, kappa, rozpoznávajúcu špecifický nádorový antigén lymfoblastoidnej bunkovej línie označenej skratkou MSB1. Tento hybridóm je uložený vo Virologickom ústave SAV, Mlynská dolina 1, 817 03 Bratislava.

Výhodou hybridómu je, že produkuje izotypovo homogénnu protilátku, tzv. monoklonálnu protilátku, ktorá rozpoznáva špecifický nádorový antigén lymfoblastoidnej bunkovej línie označenej skratkou MSB1 a tým je ju možné použiť na identifikáciu špecifického nádorového antigénu pri diferenciálnej diagnostike nádorových ochorení hydiny. Jednobunkový lymfocytárny hybridóm MSB-NTP-1 rastie in vivo v peritoneálnej dutine BALB/c myši za súčasnej tvorby ascites. Rastie aj in vitro v kultivačných médiách vhodných pre živočíšne bunky. Tak tiež po zmrazení a uložení v tekutom dusíku a po opätovnom rozmrazení si zachováva svoju schopnosť produkovať monoklonálnu protilátku rozpoznávajúcu špecifický nádorový antigén lymfoblastoidnej bunkovej línie označenej skratkou MSB1. Neobsahuje na rozdiel od konvenčných antisér nevhodné, nešpecifické, balastné protilátky.

#### Príklad 1

Pre prípravu hybridnej bunkovej línie sa použije  $2 \cdot 10^7$  buniek myšej 2-amíno-hydroxy-8-azapurín (8-azaguanín) rezistentnej bunkovej línie, ktorá sa pomocou 1 ml 50 perc. hmot. polyetylén glykolu spoja s  $1 \cdot 10^8$  slezinových lymfoidných buniek myši imunizovanej  $3 \cdot 10^8$  MSB1 lymfoblastoidných buniek. V priebehu 14 dní vyrastú pod selektívnym tlakom kyseliny 4-amíno-pteroylglutamovej (amínopterínu) hybridné bunkové línie, ktoré produkujú monoklonálne protilátky rozpoznávajúce špecifický nádorový antigén lymfoblastoidnej bunkovej línie označenej skratkou MSB1. Tieto bunky sa 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 1640, ktoré obsahuje

100 mg . ml<sup>-1</sup> tetrahydrátu dusičnatu vápenatého,

2 000 mg . ml<sup>-1</sup> D-glukózy,

100 mg . ml<sup>-1</sup> heptahydrátu síranu horečnatého,

400 mg . ml<sup>-1</sup> chloridu draselného,

1 512 mg . ml<sup>-1</sup> hydrogenfosforečnanu sodného,

6 000 mg . ml<sup>-1</sup> monohydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného,

100 mg . ml<sup>-1</sup> kyseliny 2-amíno-5-guanidínoválérovej (arginínu),

50 mg . ml<sup>-1</sup> kyseliny 2-amínosukcinamovej (asparagínu),

20 mg . ml<sup>-1</sup> kyseliny 2-amínogantárovej (kyseliny asparágovej),

- 50 mg . ml<sup>-1</sup> kyseliny 3',3'-ditiobis(2-amíno-propánovej) (cystínu),
- 20 mg . ml<sup>-1</sup> kyseliny 2-amínoglutárovej (kyseliny glutamovej),
- 300 mg . ml<sup>-1</sup> kyseliny 2-amínoglutarámovej (glutamínu),
- 1 mg . ml<sup>-1</sup> kyseliny 2-amínoglutaraminyl-2-merkaptopropionyl-amínooctovej (glutatioonu t. j. glutaminyl-cysteinyl-glycínu),
- 10 mg . ml<sup>-1</sup> kyseliny amínooctovej (glycínu),
- 15 mg . ml<sup>-1</sup> kyseliny -amíno-1-imidazol-4-propiónovej (histidínu),
- 50 mg . ml<sup>-1</sup> kyseliny 2-amíno-3-metylvalérovej (izoleucínu),
- 50 mg . ml<sup>-1</sup> kyseliny 2-amíno-4-metylvalérovej (leucínu),
- 40 mg . ml<sup>-1</sup> kyseliny 2,6-diamínohexánovej (lyzínu),
- 15 mg . ml<sup>-1</sup> kyseliny 2-amíno-4-(metyltio)-maslovej (metionínu),
- 15 mg . ml<sup>-1</sup> kyseliny 2-amíno-3-fenylpropiónovej (fenylalanínu),
- 20 mg . ml<sup>-1</sup> kyseliny 2-pyrolidínkarboxylovej (prolínu),
- 30 mg . ml<sup>-1</sup> kyseliny 2-amíno-3-hydroxypropiónovej (serínu),
- 20 mg . ml<sup>-1</sup> kyseliny 2-amíno-3-hydroxymaslovej (treonínu),
- 5 mg . ml<sup>-1</sup> kyseliny 2-amíno-3-hydroxypropiónovej (serínu),
- 20 mg . ml<sup>-1</sup> kyseliny 2-amíno-3-hydroxymaslovej (treonínu),
- 5 mg . ml<sup>-1</sup> kyseliny 2-amíno-3-(3-indolyl)-propiónovej (tryptofánu),
- 20 mg . ml<sup>-1</sup> kyseliny 2-amíno-3-(4-hydroxy-fenyl)-propiónovej (tyrozínu),
- 20 mg . ml<sup>-1</sup> kyseliny 2-amíno-3-metylmaslovej (valínu),
- 0,2 mg . ml<sup>-1</sup> kyseliny 5-{2-oxoimidazolidíno/4,5-c/iol-2-yl}pentánovej (biotínu),
- 0,005 mg . ml<sup>-1</sup> kobalt[-(5,6-dimetylbenzimidazolyl)]-kobalt-kyanokobamid vitamínu B<sub>12</sub>,
- 0,250 mg . ml<sup>-1</sup> D-N-(2,4-dihydroxy-3,3-dime-

- tylbutyryl]-2-amínopropionát vápenatý (pantotenát vápenatý),
- 3 mg . ml<sup>-1</sup> 2-hydroxyetyltrimetylamóniumchlorid (cholínchlorid),
- 1 mg . ml<sup>-1</sup> kyseliny N-(2-amíno-4-hydroxy-pteridín-6-ylmetyl)-p amínobenzoovej (kyseliny listovej),
- 35 mg . ml<sup>-1</sup> (1,2,3,5,4,6/cyklohezándexol) (myenozítolu),
- 1 mg . ml<sup>-1</sup> pyridín-3-karboxamidu (vitamínamidu),
- 1 mg . ml<sup>-1</sup> kyseliny 4-amínobenzoovej (kyseliny p-amínobenzoovej),
- 1 mg . ml<sup>-1</sup> 3-hydroxy-4,5-bis(hydroxymetyl)-2-metylpyridínchloridu (pyridoxínchloridu),
- 0,2 mg . ml<sup>-1</sup> 7,8-dimetyl-10-(1'-D-ribityl)izoloxazínu (riboflavínu),
- 1 mg . ml<sup>-1</sup> 3-(4-amíno-2-metyl-pyrimidyl-5-metyl)-5-(2-hydroxyetyl)-4-metyltiazolu (tiamínchloridu),
- 2 000 mg . ml<sup>-1</sup> hydrogenuhličitanu sodného doplnenom s 2 mmólmi kyseliny 2-amínoglutarámovej (glutamínu),
- 5 . 10<sup>-5</sup> mólov 2-merkptoetanolu,
- 100 µg . ml<sup>-1</sup> O-L-2-deoxy-2-(metylamíno)-glukopyranozyl-(1-2)-O-L-deoxy-3-C-formyllyxofuranozyl-(1-4)-1,3-deoxy-1,3-diguanidoscyloinozytsulfátu (streptomycínsulfátu),
- 100 jednotiek na milimeter kyseliny x-(N-fenylacetaamido)-penicilánovej (penicílinu G),
- 1 mmól kyseliny N-2-hydroxyetylpipezazín-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 pripraveného kultivačného média je 7,2. Po zatuhnutí agaru sa na vrstvu 0,5 % hmot. agaru naniesie 100 hybridných buniek v 0,25 % hmot. agare. Po 10 dňoch vyrastú kolónie, ktoré sa pomnožia v médiu RPMI 1 640 doplnenom s 2 mmólmi kyseliny 2-amínoglutarámovej (glutamínu), 5 . 10<sup>-5</sup> mólov 2-merkptoetanolu, 100 µg . ml<sup>-1</sup> O- -L-2-deoxy-2-(metylamíno)-glukopyranozyl-(1-2)-O- -L-deoxy-3-C-formyllyxofuranozyl-(1-4)-1,3-deoxy-1,4-diguanidoscyloinozitsulfátu (streptomycínsulfátu), 100

jednotiek na milimeter kyseliny 6-(n-fenyl-acetamido)-penicilánovej (penicilínu G), 1 mmól kyseliny N-2-hydroxyetyl-piperazín-N'-2-etánsulfonovej (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 MSB-NTP-1 produkujúcich 10 až 100  $\mu$ g monoklonálnej IgG1, kappa, protilátky rozpoznávajúcej špecifický nádorový antigén lymfoblastoidnej bunkovej línie označenej skratkou MSB1.

#### Príklad 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.

Myši lymfocytárny hybridóm MSB-NTP-1 sa kultivuje pri teplote 37 °C. Stredný generálny čas je 22 hodín, modálny počet chromozómov je 24 mesiacov po fúzii 70 chromozómov. Produkovaná protilátka je myšou imunoglobulín rozpoznávajúci špecifický nádorový antigén lymfoblastoidnej bunkovej línie označenej skratkou MSB1, triedy IgG1, kappa.

Monoklonálna protilátka produkovaná myšou lymfocytárnym hybridómom MSB-NTP-1 môže byť použitá vo veterinárnej praxi pri vyšetrovaní a diferenciálnej diagnostike nádorových ochorení hydiny.

#### PREDMET VYNÁLEZU

Myši lymfocytárny hybridóm MSB-NTP-1, produkujúci monoklonálnu protilátku proti

špecifickému nádorovému antigénu bunkovej línie MSB1, podtriedy IgG1, kappa.