



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

262264

(11) (B1)

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

(22) Přihlášeno 03 10 86

(21) PV 7159-86.W

(40) Zveřejněno 16 08 88

(45) Vydáno 15 06 89

(75)

Autor vynálezu

KOVÁŘ JAN RNDr. CSc., FRANĚK FRANTIŠEK RNDr. DrSc.  
člen korespondent ČSAV, PRAHA

(54) Způsob kultivace hybridomů a myelomových buněk

Způsob kultivace hybridomů a myelomových buněk na syntetickém kultivačním médiu, které obsahuje základní složky jako jsou anorganické soli, monosacharidy, aminokyseliny, vitaminy, látky tlumící změny pH a indikátor změny pH, a suplement spočívá v tom, že se kultivace provádí na základním médiu v přítomnosti  $2 \times 10^{-5}$  až  $1 \times 10^{-2}$  mol/l suplementu, tvořeného nejméně jednou vodorozpustnou sloučeninou železa. Kultivaci je výhodné provádět ještě v přítomnosti sloučenin stopových biogenních prvků, kyseliny askorbové, steroidních látek nebo aminu při teplotě 4 až 40 °C, pH kultivačního média 6,0 až 8,0 v atmosféře nad kulturou obsahující 1 až 10 % obj. oxidu uhličitého.

Vynález se týká způsobu kultivace hybridomů a myelomových buněk in vitro.

Hybridomy konstruované somatickou hybridisací myelomové buňky a lymfocytu syntetizujícího protilátkou jsou průmyslově používány k výrobě monoklonálních protilátek. Myelomové buňky, do nichž je metodami genového inženýrství zaveden gen pro biologicky aktivní bílkovinu, například enzym, inhibitor enzymu, hormon, imunoregulátor, jsou též průmyslově používány pro výrobu těchto bílkovin.

Dosud se hybridomy a myelomové buňky kultivují tak, že se buňky nejprve namnoží v laboratorních nádobách, jako jsou plastické misky a lahve, kultivace a produkce bílkoviny se dokončí v průmyslovém fermentoru. Monoklonální protilátka nebo jiná do kultivačního média vyloučená bílkovina se získává z kultivačního média po odstředění nebo odfiltrování buněk. Isolace produktované bílkoviny je tím obtížnější a nákladnější, čím více bílkovin původní kultivační médium obsahovalo. Koncentrace produkované bílkoviny, například monoklonální protilátky v kultivačním médiu, je poměrně nízká. Ekonomická výhodnost výroby je limitována cenou složek kultivačního média. Syntetické kultivační médium obsahuje základní kultivační složky a suplement.

Základní kultivační složky jsou anorganické soli, například chlorid sodný a fosforečnan sodný, monosacharidy, například glukosa nebo galaktosa, aminokyseliny, například tryptofan, methionin, threonin, glutamin, vitaminy, například thiamin a nikotinamid, látky tlumící změny pH, například N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina, popřípadě pyrohroznán sodný, antibiotika a indikátor změny pH. Tyto základní kultivační složky jsou pro hybridomy a myelomové buňky, stejně tak jako pro jiné živočišné buňky samy o sobě nedostačující, a proto jsou doplňovány 10 % objemovými krevního séra, například hovězího, koňského nebo fetálního telecího séra. Krevní sérum vnáší do kultivačního média neznámé látky, z nichž některé růst buněk podporují, jiné mohou růst potlačovat. Krevní séra je proto nutné před použitím testovat a vybírat vhodné šarže. Tím vzrůstají náklady na výrobu kultivačního média. Protože vhodných růst podporujících krevních sér byl nedostatek, byly vyvinuty receptury kultivačních médií, tzv. bezsérových, v nichž je sérum nahrazeno několika definovanými bílkovinami, nejčastěji transferinem, sérovým albuminem a insulinem a případně dalšími látkami, jako jsou mastné kyseliny, aminy a nízkomolekulární hormony (Kovář J., Franěk F., Methods in Enzymology 121:277, 1986).

Veškeré bílkoviny dosud přidávané do kultivačních médií pro kultivaci hybridomů nebo myelomových buněk musí být prosté toxických příměsí, v důsledku tohoto vysokého stupně čistoty je jejich cena poměrně vysoká.

Další nevýhodou stávajících kultivačních médií je obtížná izolace produktů životní činnosti hybridomů popřípadě myelomových buněk z kultivačního média, která spočívá v několika-násobném oddělování žádaných produktů bílkovinné povahy od bílkovin obsažených v kultivačním médiu v mnohonásobném přebytku.

Uvedené nevýhody odstraňuje způsob kultivace hybridomů nebo myelomových buněk na syntetickém kultivačním médiu obsahujícím základní složky, které jsou tvořeny anorganickými solemi, monosacharidy, aminokyselinami, vitaminy, látkami tlumící pH, indikátorem změny pH a suplementem podle vynálezu. Jeho podstata spočívá v tom, že se kultivace provádí na základních složkách v přítomnosti  $2 \times 10^{-5}$  až  $1 \times 10^{-2}$  mol/l vodorozpustných sloučenin železa.

Kultivaci je vhodné provádět dále v přítomnosti 0,002 až 2 mg/l sloučenin biogenních stopových prvků, například selenu a zinku, nebo 1 až 100 mg/l kyseliny askorbové, popřípadě 0,000 1 až 0,01 mg/l steroidních látek, jako je třeba hydrokortison.

Kultivaci je výhodné provádět též za přítomnosti 0,1 až 15 mg/l aminů, například ethanolaminu.

Kultivace hybridomů, popřípadě myelomových buněk se provádí při teplotě 4 až 40 °C a pH kultivačního média 6,0 až 8,0 a v atmosféře nad kulturou obsahující 1 až 10 % obj. oxidu uhličitého.

Bylo zjištěno, že jedinou zcela nepostradatelnou bílkovinnou složkou bezsérového kultivačního média je transferin (Kovář J., Franěk F., *Methods in Enzymology* 121:277, 1986). Jelikož transferin funguje jako přenašeč železa z prostředí do buňky, byly v dalších pokusech přidávány do kultivačního média různé vodorozpustné sloučeniny železa ve vyšších koncentracích než jaké kdy byly v kultivačních médiích dosud použity.

Řada autorů (například Phillips P. D., Cristofalo V. J., *Exp. Cell Res.*, 134:297, 1981; Perez-Infante V., Mather J. P., *Exp. Cell Res.*, 142:325, 1982; Taetle R., Thyner K., Castagnola J., To D., Mandelsohn J., *J. Clin. Invest.*, 57:1 061, 1985) použila jako náhradu transferinu vodorozpustné sloučeniny železa v koncentracích  $1 \times 10^{-6}$  až  $20 \times 10^{-6}$  mol/l. Tyto koncentrace jsou však v případě hybridomů a myelomových buněk nedostatečné.

Ukázalo se, že sloučeniny železa nejsou pro hybridomy a myelomové buňky toxické až do koncentrace  $1 \times 10^{-2}$  mol/l a naopak umožňují růst hybridomů a myelomových buněk v kultivačním médiu, v němž není přítomna žádná bílkovina. Mezi sloučeniny železa, schopné nahradit transferin, patří například síran železnatý, chlorid železitý, citronan železitý a ferikyanid draselný. Účinné koncentrace se pohybují v rozmezí  $2 \times 10^{-5}$  až  $10^{-2}$  mol/l.

Hlavními výhodami způsobu kultivace podle vynálezu je podstatné snížení ceny kultivačního média, které se promítá i do ceny buňkami vylučované bílkoviny a snadná izolace bílkoviny produkované hybridomovými popřípadě myelomovými buňkami, protože buňkami vylučovaná bílkovina je jedinou bílkovinou nacházející se po kultivaci v kultivačním médiu.

Způsob kultivace hybridomů a myelomových buněk podle vynálezu je dokumentován v následujících příkladech.

#### P ř í k l a d 1

Buňky hybridomu PLV-01 byly inokulovány v množství  $50 \times 10^3$  buněk/ml do 6 ml bezbílkovinného kultivačního média, které jako základní složky obsahovalo médium RPMI 1 640, L-glutamin (300 µg/ml), pyrohroznan sodný (110 µg/ml), N-2-hydroethylpiperazin-N'-2-ethansulfonovou kyselinu ( $1,5 \times 10^{-2}$  mol/l), penicilin (100 jednotek/ml), streptomycin (100 µg/ml) a gentamycin (40 µg/ml). Bezbílkovinné kultivační médium pak obsahovalo jako suplement tyto přidané látky: ethanolamin ( $2 \times 10^{-5}$  mol/l), kyselinu askorbovou ( $2 \times 10^{-5}$  mol/l), hydrokortison ( $5 \times 10^{-9}$  mol/l), síran kademnatý ( $\text{CdSO}_4 \cdot 8/3 \text{H}_2\text{O}$ ,  $5 \times 10^{-8}$  mol/l), chlorid kobaltnatý ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ,  $1 \times 10^{-8}$  mol/l), síran měďnatý ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ,  $1 \times 10^{-8}$  mol/l), molybdenan amonný ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ,  $5 \times 10^{-10}$  mol/l), chlorid manganatý ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ,  $5 \times 10^{-10}$  mol/l), síran nikelnatý ( $\text{NiSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ,  $2,5 \times 10^{-10}$  mol/l), seleničitan sodný ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ,  $4 \times 10^{-8}$  mol/l), křemičitan sodný ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ,  $2 \times 10^{-7}$  mol/l), chlorid cínatý ( $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ,  $2,5 \times 10^{-10}$  mol/l), vanadičnan amonný ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ,  $2,5 \times 10^{-9}$  mol/l), síran zinečnatý ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  mol/l), a citronan železitý ( $5 \times 10^{-4}$  mol/l).

Po 4 dnech kultivace v termostatu ve vlhčené atmosféře 5 % obj. oxidu uhličitého ve vzduchu při teplotě 37 °C a pH = 7,6 se buňky namnožily na  $1,58 \times 10^6$  buněk/ml. Počet buněk se tedy během kultivace přibližně ztřicetinásobil.

#### P ř í k l a d 2

Stejným způsobem jako v příkladu 1 byly kultivovány buňky myelomu FO a hybridomu CMH-02 v 1-ml objemech kultivačního média v jamkách plastické kultivační destičky. Po jednom dnu kultivace za výše uvedených podmínek byl stanoven počet buněk v jamce a po dalších 24 hodinách byl stanoven počet buněk znovu. Tak byla stanovena střední doba zdvojení v exponenciální růstové fázi, která je pro myelom FO 15,6 hod. a pro hybridom CMH-02 14,6 hod.

## P ř í k l a d 3

Buňky hybridomu PLV-01 byly inokulovány v množství  $10 \times 10^3$  buněk do 0,1 ml základních složek uvedených v příkladu 1. Jako suplement bylo do kultivačního média přidáno  $2 \times 10^{-4}$  mol/l ferikyanidu draselného.

Po třech dnech kultivace při teplotě  $37^\circ\text{C}$  a 4,5 % obj. oxidu uhličitého, ve vlhčené atmosféře, při pH média 7,4 se buňky namnožily na  $42 \times 10^3$ .

## P ř í k l a d 4

Buňky hybridomu PLV-01 byly inokulovány v množství  $10 \times 10^3$  buněk do 0,1 ml základních složek uvedených v příkladu 1. Jako suplement bylo do kultivačního média přidáno  $1 \times 10^{-4}$  mol/l síranu železnatého.

Po třech dnech kultivace při teplotě  $37^\circ\text{C}$  a 4,5 % obj. oxidu uhličitého ve vlhčené atmosféře při pH média 7,4 se buňky namnožily na  $33 \times 10^3$ .

## P ř í k l a d 5

Buňky hybridomu PGG-05 byly inokulovány v počtu  $60 \times 10^3$  buněk do objemu 1 ml bezbílkovinného kultivačního média jako v příkladu 1. Kultivace probíhala za stejných podmínek jako v příkladu 1.

Pro srovnání byl tentýž hybridom v téže množství inokulován do základních složek, k nimž byl přidán transferin v koncentraci 5 mg/l a insulin v koncentraci 10 mg/l.

Po 4 dnech kultivace byl stanoven počet buněk v obou kultivačních médiích a koncentrace monoklonální protilátky, vyjádřená v relativních jednotkách absorpance s použitím enzymo-  
imunologického testu založeného na stanovení peroxidasové aktivity.

Při kultivaci podle vynálezu v přítomnosti citronanu železitého v bezbílkovinném kultivačním médiu stoupl počet buněk na  $675 \times 10^3$ /ml a koncentrace monoklonální protilátky vyjádřená v relativních jednotkách absorpance měla hodnotu  $A_{490} = 1,32$ . Ve srovnávacím pokusu při kultivaci v bílkovinném médiu s transferinem a insulinem stoupl počet buněk na  $731 \times 10^3$ /ml a koncentrace monoklonální protilátky vyjádřená v relativních jednotkách absorpance měla hodnotu  $A_{490} = 1,26$ .

## P Ř E D M Ě T V Y N Ā L E Z U

1. Způsob kultivace hybridomů a myelomových buněk na syntetickém kultivačním médiu obsahujícím základní složky tvořené anorganickými solemi, monosacharidy, aminokyselinami, vitaminy, látkami tlumící změny pH a indikátorem změny pH, a suplement, vyznačující se tím, že se kultivace provádí na základních složkách v přítomnosti  $2 \times 10^{-5}$  až  $1 \times 10^{-2}$  mol/l suplementu tvořeného nejméně jednou vodorozpustnou sloučeninou železa, například chloridem železitým, citronanem železitým, síranem železnatým nebo ferikyanidem draselným při teplotě 4 až  $40^\circ\text{C}$  a pH kultivačního média 6,0 až 8,0 v atmosféře nad kulturou obsahující 1 až 10 % obj. oxidu uhličitého.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se kultivace provádí v přítomnosti 0,001 až 2 mg/l sloučenin stopových biogenních prvků, například selenu a zinku.

3. Způsob podle bodů 1 a 2, vyznačující se tím, že se kultivace provádí v přítomnosti 1 až 100 mg/l kyseliny askorbové.

4. Způsob podle bodů 1 až 3, vyznačující se tím, že se kultivace provádí v přítomnosti 0,000 1 až 0,01 mg/l steroidních látek, například hydrokortisonu.

5. Způsob podle bodů 1 až 4, vyznačující se tím, že se kultivace provádí v přítomnosti 0,1 až 15 mg/l aminů, například ethanolaminu.