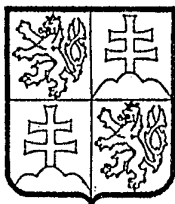


ČESKÁ A SLOVENSKÁ  
FEDERATIVNÍ  
REPUBLIKA  
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD  
PRO VYNÁLEZY

# PATENTOVÝ SPIS 275 657

(21) Číslo přihlášky : 6266-89.N

(22) Přihlášeno : 06 11 89

(30) Prioritní data :

(13) Druh dokumentu : B 6

(51) Int. Cl.<sup>4</sup> :

C 12 N 5/00

(40) Zveřejněno : 11 06 91

(47) Uděleno : 20 12 91

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 18 03 92

(73) Majitel patentu : ÚSTAV EXPERIMENTÁLNEJ ONKOLÓGIE SAV, BRATISLAVA

(72) Původce vynálezu : POLÁKOVÁ KATARÍNA RNDr. CSc.,  
CHORVÁTH BRANKO MUDr. CSc.,  
PLEŠKOVÁ IVETA RNDr.,  
SEDLÁK JÁN RNDr. CSc.,  
KARPATOVÁ MÁRIA PhMr.,  
DURAJ JOZEF RNDr. CSc., BRATISLAVA

(54) Název vynálezu : Myší lymfocytárny hybridóm Bra 23/9/a

(57) Anotace :

Riešenie sa týka myšieho lymfocytárneho hybridómu Bra 23/9/a produkujúceho monoklonálnu protilátku podtriedy IgG<sub>2a</sub> proti HLA antigénu I. triedy - nepoly-<sup>2</sup>morfnej determinante, ktorý je uložený v zbierke hybridómov a bunkových kultúr Oddelenia molekulárnej imunológie Ústavu experimentálnej onkológie SAV, ul. Čsl. armády 21, 812 32 Bratislava. Monoklonálna protilátka Bra 23/9/a je vhodná na imunofenotypovanie nádorových buniek, na spresnenie imunocytochemickej diagnostiky niektorých nádorov, sledovanie expresie transplantačných antigénov na normálnych a nádorových bunkách, v laboratórnej technike transplantačnej imunológie, v biochemickej izolácii HLA antigénov I. triedy.

Vynález sa týka myšieho lymfocytárneho hybridómu Bra 23/9/a t.j. hybridnej kultúry buniek jednobunkového (monoklonálneho) pôvodu, získanej bunkovou fúziou myšej myelómovej bunkovej línie Sp2/0 a slezinových lymfoidných buniek syngénnych experimentálnych zvierat, imunizovaných ľudskou non-T, non-B ALL leukemickou bunkovou líniou. Hybridóm produkuje in vitro aj in vivo myšiu monoklonálnu protilátku triedy IgG<sub>2a</sub>, rozpoznávajúcu ľudský HLA antigén I. triedy (nepolymorfnú determinantu).

Pôvodne sa protilátky proti natigénom bunkového povrchu získavali konvenčnou imunizáciou pokusných zvierat, pri čom vznikala heterogénna zmes protilátok rôznych tried a podtried ako aj imunochemických špecifít. Skrížené reaktivity takýchto preparátov spravidla nie je možné odstrániť vysýtením in vitro, ktoré je okrem toho neštandardným postupom, vyžadujúcim značné množstvá vysycujúcich buniek.

Uvedené nevýhody, čo sa týka protilátok proti HLA antigénom (antigénom MHC komplexu I. triedy), odstraňuje riešenie podľa vynálezu, ktorého podstata spočíva v tom, že bol získaný myší lymfocytárny hybridóm produkujúci monoklonálnu protilátku triedy IgG<sub>2a</sub>, proti HLA antigénu I. triedy (nepolymorfnej determinante). Tento hybridóm je uložený v zbierke hybridómov a bunkových kultúr Oddelenia molekulárnej imunológie Ústavu experimentálnej onkológie SAV, ul. Čsl. armády 21, 812 32 Bratislava, pod označením Bra 23/9/a.

Uvedený hybridóm bol získaný spôsobom známym z odbornej literatúry (Köhler, G., Milstein, C.: Nature 256 /1975/, 495), klonovaním buniek, získaných somatickou hybridizáciou myšej myelómovej bunkovej línie Sp2/0 a slezinových lymfoidných buniek syngénneho zvieraťa (inbredný chov BALB/c), imunizovaného opakovanými intraperitoneálnymi dávkami ( $2 \cdot 10^7$  buniek/dávka) bunkovej suspenznej humánnej non-T, non-B ALL leukemickej bunkovej línie; subklon Bra 23/9/a s vysokou produkciou protilátky bol získaný opakovaným klonovaním limitujúcim riedením.

Výhoda získaného unikátneho hybridómu podľa vynálezu spočíva predovšetkým v produkcii monoklonálnej protilátky, rozpoznávajúcej ľudský HLA antigén I. triedy a špecificky imunoprecipitujúcej glykopeptidické reťazce gp 44, p 12, čo má experimentálne laboratórne využitie v transplantačnej imunológii a onkológii.

#### P r í k l a d

$10^8$  slezinových buniek imunizovanej myšky inbredného chovu BALB/c sa fúzuje s  $6 \cdot 10^7$  Sp2/0 myelómových buniek v prítomnosti 45%ného polyetylén glykolu (PEG), klonuje limitujúcim riedením na vrstve syngénnych myších thymocytov ( $2 \cdot 10^5$  buniek/mikrokultúra) v selekčnom médiu hypoxantín-aminopterín-tymidín (HAT).

Subklon Bra 23/9/a s vysokou produkciou monoklonálnych protilátok, selektovaných na základe špecifickej reaktivity s panelom ľudských leukemických/lymfónových bunkových línií a hematopoetickými bunkami zdravých darcov, sa získal opakovaným klonovaním technikou limitujúceho riedenia v mikroplatinách, v kultivačnom médiu s obsahom 10% fetálneho telacieho séra, až do vzniku stabilnej monoklonálnej bunkovej kultúry, produkujúcej monoklonálnu protilátku danej špecificity.

Produkcia monoklonálnej protilátky danej špecificity vo vysokej koncentrácii sa uskutoční tak, že sa inokuluje  $5 \cdot 10^6$  hybridómových buniek do peritoneálnej dutiny syngénnych myší, premedikovaných intraperitoneálnym podaním tetrametylpentadekán. Mono-

klonálna protilátka, prítomná v supernatante bunkovej kultúry resp. v ascitickej tekutine získanej z inokulovaných myšiek, špecificky rozpoznáva ľudský HLA antigén I. triedy (nepolymorfnú determinantu) a špecificky imunoprecipituje glykopeptidické reťazce gp (44, p12).

Bunky hybridómu rastú ako suspenzná kultúra buniek s morfológickou myších myelómových buniek. Základným kultivačným médiom je RPMI 1640 s 10% fetálnym telacím sérom. Hybridóm je kultivovaný pri teplote 37 °C v 0,5% oxide uhličitom. Zo zmrazených ampulovaných vzoriek pôvodného hybridómu (v tekutom dusíku) je možné nové kultivovanie hybridómu s produkciou monoklonálnej protilátky s pôvodnou špecificitou.

Myši lymfocytárny hybridóm Bra 23/9/a a ním produkovaná monoklonálna protilátka môžu byť technologicky pripravované a komerčne využívané v diagnostickom fenotypovaní buniek nádorov, v diagnostike imunocytochemickými metódami niektorých typov novotvarov, vo vyhodnocovaní metastatického potenciálu nádorových buniek, v študiu in vitro indukovanej expresie membránových antigénov, v imunochemickej purifikácii HLA antigénov I. triedy.

#### P A T E N T O V É      N Á R O K Y

Myši lymfocytárny hybridóm Bra 23/9/a, produkujúci monoklonálnu protilátku podtriedy IgG<sub>2a</sub> proti ľudskému HLA antigénu I. triedy - nepolymorfnej determinante.