



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

267 400

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 5/00

(21) PV 7047-88.7.
(22) Prihlášené 25 10 88

(40) Zverejnené 13 06 89
(45) Vydané 14 12 90

(75)
Autor vynálezu

ŠVEC JURAJ prof. MUDr. DrSc., VESELOVSKÁ ZUZANA RNDr.,
KESZÉGHOVÁ VIERA MUDr. CSc., REINEROVÁ MARTA RNDr. CSc.,
GRŇOVÁ HELENA, BRATISLAVA, MIKÓCZIOVÁ MÁRIA, TOMÁŠOV

(54)

Myší lymfocytárny hybridóm RG-12

(57) Riešenie sa týka myšieho lymfocytárneho hybridómu, produkujúceho monoklonálnu protilátku proti nádorovému antigénu, združenému s bunkami ľudského malígneho melanómu, ktorý je uložený v zbierke hybridómov Ústavu experimentálnej onkológie SAV v Bratislave pod označením RG-12. Monoklonálna protilátka hybridómu RG-12 je vhodná na použitie pri diagnostike malígneho melanómu a monitorovaní priebehu tohto zhubného ochorenia stanovením hladín cirkulujúcich protinádorových protilátok metódou kompetitívneho rádioimunitného testu a pri diferenciálnej diagnostike malígnych melanómov, benígnych kožných nádorov a nádorov neuroektodermálneho pôvodu metódou imunohistochemických vyšetrení parafínových rezov tkanív.

Vynález sa týka nového bunkového hybridómu, zostrojeného bunkovou fúziou myšej myelómovej línie Sp2/0 a myšej slezinovej lymfoidnej bunky, produkujúcej protilátku proti membránovému antigénu buniek línie ľudského malígneho melanómu HMB-2.

Zavedením hybridómovej technológie sa otvorila cesta k príprave monoklonálnych protilátok, namierených proti antigénnym determinantom buniek nižších i vyšších organizmov vrátane buniek nádorových. Protinádorové monoklonálne protilátky našli široké uplatnenie v imunohistochemickej, rádioimunologickej a lokalizačnej diagnostike primárnych nádorov a ich metastáz a v kontrole progresie nádorovej choroby po terapii. Prevážna väčšina dosiaľ pripravených protinádorových monoklonálnych protilátok je namierená proti antigénom transplantačného typu, antigénom cytoskeletu, diferenciačným antigénom a antigénom embryonálneho pôvodu. V súčasnosti jestvuje vo svete iba niekoľko monoklonálnych protilátok reagujúcich s neoantigénmi združenými s nádormi rovnakej histogenezy.

V ostatných rokoch sa podarilo vyvinúť monoklonálne protilátky proti antigénom združeným s bunkami ľudského kožného malígneho melanómu [Ziai, M. R., Imberti, L., Nicotra, M. R., Badaracco, G., Segatto, O., Natali, P. G., Ferrone, S.: Analysis with monoclonal antibodies of the molecular and cellular heterogeneity of human high molecular weight melanoma associated antigen. *Cancer Research* **47**, (1987), 2474; Hotta H., Ross, A. H., Huebner, K., Isobe, M., Wendeborn, S., Chao, M. V., Risciardi, R. P., Tsujimoto, Y., Croce, C. M., Koprowski, H.: Molecular cloning and characterization of an antigen associated with early stages of melanoma tumor progression. *Cancer Research*, **48**, (1988), 2955]. Žiadna z nich však nie je prísne špecifická pre bunky malígneho melanómu. Dokázala sa ich súčasná reaktivita s tkanivami a nádormi neuroektodermálneho pôvodu ako i s nádormi inej histogenezy [Steplewski, Z., Herlyn, D., Clark, W. H., Ross, A. H., Blaszyk, M., Pak, K. Y., Koprowski, H.: Production and characterization of monoclonal antibodies against human malignant melanoma. *Cancer Investigation*, **1**, (1983), 215; Hotta a spol., *Cancer Research*, **48**, (1988), 2955]. Väčšina dosiaľ vyvinutých antimelanómových protilátok reaguje s antigénmi, ktoré sa denaturujú formolom (fixatívum, rutínne používané na fixáciu tkanív pre histologické vyšetrenie) a preto nie sú vhodné pre imunohistochemické testy. Pre tieto testy je komerčne pripravovaných niekoľko antimelanómových monoklonálnych protilátok s rôznym stupňom špecificity firmou Dakopatts A. S. (Santa Barbara, California, USA;) firmou Hybritech Company (San Diego, California, USA) a i. V súčasnosti nie sú komerčne dostupné antimelanómové monoklonálne protilátky v súpravách pre rádioimunodiagnostické vyšetrenie cirkulujúcich antimelanómových protilátok v sérach pacientov s malígnym melanómom.

Uvedené nedostatky do značnej miery od-

straňuje hybridóm, produkujúci monoklonálnu protilátku proti antigénu združenému s bunkami ľudského malígneho melanómu, ktorý je uložený v zbierke hybridómov Ústavu experimentálnej onkológie SAV v Bratislave, ul. Čsl. armády 21, pod označením RG-12.

Hybridóm RG-12 bol získaný fúziou slezinovej bunky myši kmeňa Balb/c, umunizovanej bunkami línie ľudského malígneho melanómu HMB-2, s bunkou myšieho plazmocytómu Sp2/O spôsobom, popísaným v odbornej literatúre [Köhler, G., Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**, (1975), 495] a následným klónovaním súboru hybridných buniek štandardnou technikou.

Získaný hybridóm produkuje monoklonálnu protilátku, ktorá sa špecificky viaže na nádorový antigén, prítomný v bunkách ľudského malígneho melanómu a v bunkách nádorov epitelového pôvodu (karcinómy) nie však v bunkách zdravých tkanív.

Bunky hybridómu RG-12 možno pomnožovať v podmienkach in vitro v štandardných médiách pre živočíšne bunkové kultúry, alebo in vivo v peritoneálnej dutine myši kmeňa Balb/c. Viabilné bunky hybridómu môžu byť uchovávané v ampulkách pri -180°C v kvapalnom dusíku. Ich rozmrazením sa získavajú životaschopné kultúry, ktoré sa používajú ako zdroj monoklonálnej protilátky.

Príklad

Hybridómové bunky sa pomnožovali in vivo aplikáciou 1×10^7 buniek intraperitoneálne myšiam kmeňa Balb/c bez predchádzajúcej premedikácie. Na 21. deň rastu hybridómu v ascitovej forme bola myš utratená a ascitová tekutina bola odobraná punkciou brušnej dutiny. Získalo sa 5,6 ml ascitovej tekutiny s obsahom 6,9 mg/ml imunoglobulínu. Tento bol z ascitovej tekutiny izolovaný vyzrážaním v 2 M sírane amónnom a purifikovaný chromatografiou na kolone dietylamiñoetyl-celulózy. Ascitová tekutina obsahujúca monoklonálnu protilátku i purifikovaná protilátka vykazovala v imunohistochemickom teste na parafrínových rezoch tkanív špecifickú väzbu na bunky ľudského malígneho melanómu a bunky karcinómov, nie však na bunky zdravých tkanív a nádorov inej histogenezy. V kompetitívnom rádioimunoteste monoklonálna protilátka odhaľuje cirkulujúce protinádorové protilátky v 85 % sér pacientov s malígnym melanómom.

V podmienkach in vitro rastie hybridóm RG-12 ako suspenzná kultúra. Bunky hybridómu majú veľkosť a tvar charakteristický pre myelómové bunky. Obsahujú fúzované bunkové jadrá s aneuploidným karyotypom. Ako rastové médium sa používa minimálne esenciálne médium MEM (Ústav sér a očkovacích látok, Praha) obohatené 10% fetálneho telacieho séra (Biovetta, Ivanovice na Hané), gentamycínom a nárazníkovým roztokom bikarbonátu sodného. Kultúry sú udržiavané v termostate pri 37°C v humidifikovanej atmosfére v prítomnosti 5% CO_2 .

Za týchto podmienok je stredná generačná doba buniek hybridómu 22,5 hod. Hybridóm produkuje monoklonálny imunoglobulín triedy IgG.

Hybridóm RG-12 môže byť priemyslovo využívaný ako zdroj monoklonálnej protilátky proti malígnemu melanómu. v kompetitívnom rádioimunoteste s použitím membránových bielkovín melanómových buniek HMB-2 môže byť monoklonálna protilátka použitá pre kvantitatívne i kvalitatívne stanovenie cirkulujúcich protinádorových protilátok u pacientov s ma-

lígny melanómom pri diagnostike, diferenciálnej diagnostike a monitorovaní priebehu ochorenia po radikálnej liečbe. V imunohistochemickom vyšetrení parafrínových rezov tkanív sa monoklonálna protilátka uplatní pri diferenciálnej diagnostike malígnych melanómov a ich metastáz od benígnych pigmentovaných nádorov kože a iných nádorov neuroektodermálneho pôvodu. Potenciálne možné využitie možno očakávať pri imunoscintigrafickej lokalizačnej diagnostike metastáz malígneho melanómu in vivo.

PREDMET VYNÁLEZU

Myší lymfocytárny hybridóm RG-12, produkujúci monoklonálnu protilátku triedy IgG

proti nádorovému antigénu, združenému s bunkami ľudského malígneho melanómu.