



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

259233

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 5/00

(22) Prihlášené 04 03 86

(21) PV 1489-86.N

(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., POSPÍŠIL MILAN RNDr. CSc., PRAHA

(54) **Myší lymfocytárny hybridóm produkujúci monoklonálnu protilátku proti MSBl lymfoblastoidnej bunkovej línii**

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 povrchové antigény lymfoblastoidnej bunkovej línii označenej skratkou MSBl. Myší lymfocytárny hybridóm má použitie vo veterinárnej medicíne.

Vynález sa týka myšieho lymfocytárneho hybridómu produkujúceho monoklonálnu protilátku rozpoznávajúcu povrchové antigény lymfoblastoidnej bunkovej línie označenej skratkou MSB1.

Doposiaľ sa protilátky proti lymfoblastoidnej bunkovej línii MSB1, ktorá nesie na svojom povrchu diagnostický antigén "MATSA" 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 vyšetrovaní chovov hydiny. Zmiený 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 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 povrchovým antigénom lymfoblastoidnej bunkovej línie označenej skratkou MSB1.

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 využitelnosť takto pripraveného diagnostického séra je znížená aj tým, že jeho 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-2 bol pripravený známym spôsobom, klónovaním skupiny hybridómov v mäkkom agare, vzniklých fúziou buniek myšej 2-amino-hydroxy-8-azapurín /8-azaguanín/ rezistentnej myelómovej línie označenej NSO a slezinových buniek inbrédnej línie myši BALB/c, imunizovaných lymfoblastoidnou bunkovou líniou MSB1 /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 MSB-NTP-2 produkujúcom monoklonálnu protilátku podtriedy IgG1, kappa, rozpoznávajúcu povrchové antigény 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 povrchové antigény lymfoblastoidnej bunkovej línie označenej skratkou MSB1 a tým je ju možné použiť v diagnostických testoch vyhľadávajúcich protilátky proti nádorovým antigénom asociovaným s Marekovou chorobou. Jednobunkový lymfocytárny hybridóm MSB-NTP-2 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 po zmrazení a uložení v tekutom dusíku a opätovnom rozmrazení si zachováva svoju schopnosť produkovať monoklonálnu protilátku rozpoznávajúcu povrchové antigény lymfoblastoidnej bunkovej línie označenej skratkou MSB1. Neobsahuje na rozdiel od konvenčných antisér nevhodné, nešpecifické, 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 $3 \cdot 10^8$ MSB1 lymfoblastoidných buniek. V priebehu 14 dní vyrastú pod selektívnym tlakom kyseliny 4-amino-pteroylglutamovej /aminopterínu/ hybridné bunkové línie, ktoré produkujú monoklonálne protilátky rozpoznávajúce povrchové antigény 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 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-aminoglutarámvej /glutamínu/, 1 mg.ml⁻¹ kyseliny 2-aminoglutaraminyl-2-merkaptopropionyl-aminooctovej /glutathionu tj. glutaminyl-cysteinyl-glycínu/, 10 mg.ml⁻¹ kyseliny amino-octovej /glycínu/, 15 mg.ml⁻¹ kyseliny α -amino-1-imidazol-propiónovej /histidínu/, 50 mg.ml⁻¹ kyseliny 2-amino-3-metylvalérovej /izoleucínu/, 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 /fenylalanínu/, 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 /tryptofanu/, 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 α /5,6-dimetylbenzimidazolyl/-kobalt β -kyanokobamid vitamínu B₁₂/, 0,250 mg.ml⁻¹ D-N-/2,4-dihydroxy-3,3-dimetylbutyryl/- β -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 hydrogenuhličitanu sodného doplnenom s 2 mmol kyseliny 2-aminoglutarámvej /glutamínu/, $5 \cdot 10^{-5}$ mol 2-merkaptopetanolu, 100 μ g.ml⁻¹ O- α -L-2-deoxy-2-/metylami-no/-glukopyranozyl-/1-2/-O- α -L-2-deoxy-3-formyllyxofuranozyl-/1-4/-1,3-deoxy-1,4-diguanidoscyloinozitsulfátu /streptomycínsulfátu/, 100 jednotiek na mililiter kyseliny 6-/N-fenylacetoamido/-penicilánovej /penicilínu G/, 1 mmol kyseliny N-2-hydroxyetylpiperazín-N'-2-etán sulfonovej /Hepesu/ sa rozpustí v trikrát redetstilovanej vode a doplní trikrát redetstilovanou 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 nanesie 100 hybridných buniek v 0,25 % hmot. agare. Po 10 dňoch vyrastú kolónie, ktoré sa pomnožia v médiu RPMI 1 640 doplnenom s 2 mmol kyseliny 2-amino-glutarárovej /glutamínu/, $5 \cdot 10^{-5}$ mol 2-merkaptopetanolu, 100 μ g.ml⁻¹ O- α -L-2-deoxy-2-/metylami-no/-glukopyranozyl-/1-2/-O- α -L-2-deoxy-3-formyllyxofuranozyl-/1-4/-1,3-deoxy-1,4-diguanidoscyloinozitsulfátu /streptomycínsulfátu/, 100 jednotiek na mililiter kyseliny 6-/N-fenylacetoamido/-penicilánovej /penicilínu G/, 1 mmol kyseliny N-2-hydroxyetylpiperazín-N'-2-etán sulfonovej /Hepesu/ sa rozpustí v trikrát redetstilovanej vode a doplní trikrát redetstilovanou 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-2 produkujúcich 10 až 100 μ g monoklonálnej IgG1, kappa, protilátky rozpoznávajúcej povrchové antigény lymfoblastoidnej bunkovej línie označenej skratkou MSB1.

P r í k l a d 2

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

Myší lymfocytárny hybridóm MSB-NTP-2 sa kultivuje pri teplote 37 °C. Stredný generačný čas je 20 hodín, modálny počet chromozómov je 24 mesiacov po fúzii 75 chromozómov. Produkováaná monoklonálna protilátka je myší imunoglobulín rozpoznávajúci povrchové antigény lymfoblastoidnej bunkovej línie označenej skratkou MSB1, triedy IgG1, kappa.

Monoklonálna protilátka produkovaná myším lymfocytárnym hybridómom MSB-NTP-2 môže byť použitá vo veterinárskej praxi pri vyšetrovaní a diferenciálnej diagnostike nádorových ochorení hydiny.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Myší lymfocytárny hybridóm MSB-NTP-2, produkujúci monoklonálnu protilátku proti MSB1, lymfoblastoidnej bunkovej línii, podtriedy IgG1, kappa.