



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

260 806

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 03 10 86
(21) PV 7157-86.S

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 5/00

(40) Zveřejněno 15 06 88
(45) Vydáno 1.11.1989

(75)
Autor vynálezu

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

(54)

Suplement kultivačních médií hybridomů
a myelomových buněk

Suplement kultivačních médií hybridomů a myelomových buněk je tvořen nejméně jednou vodorozpustnou sloučeninou železa. Suplement může dále obsahovat 2×10^2 mg sloučenin stopových biogenních prvků, 1×10^{-1} až 5×10^3 mg kyseliny askorbové, 1×10^{-5} až 5×10^{-1} mg steroidních látek a 1×10^{-2} až $7,5 \times 10^2$ mg aminů na 1 mmol vodorozpustných sloučenin železa. Tento suplement je vhodnou náhradou bílkovinných suplementů jako jsou krevní séra nebo čisté bílkoviny.

Vynález se týká suplementu kultivačních médií pro hybridomy a myelomové buňky.

Dosud se hybridomy a myelomové buňky kultivují in vitro na médiích, která kromě základních složek jako jsou anorganické soli, monosacharidy, aminokyseliny, vitaminy, antibiotika, látky tlumící změny pH a indikátor změny pH musí obsahovat bílkoviny. Je známo, že v kultivačním médiu bez bílkovinných suplementů se nemohou hybridomy ani myelomové buňky množit. Proto se k základnímu médiu přidává až 10% obj. krevního séra, například hovězího, koňského nebo fetálního telecího séra. Krevní sérum vnáší do kultivačního média neznámé látky, z nichž některé růst hybridních a myelomových buněk podporují, jiné mohou růst inhibovat. Krevní séra je proto nutné před použitím testovat a vybírat vhodné šarže, čímž vzrůstají náklady na výrobu kultivačních médií. Proto bylo krevní sérum v řadě receptur na kultivační média nahrazeno směsí čistých bílkovin, například transferinem, sérovým albuminem, insulinem a případně dalšími látkami, jako jsou nenasycené mastné kyseliny, aminy a nízkomolekulární hormony.

Bílkoviny přidávané do kultivačního média musí být čištěny do vysokého stupně, aby byly prosté toxických příměsí a jejich cena je proto poměrně vysoká.

Další nevýhodou kultivačních médií, obsahujících bílkovinný suplement, je obtížná izolace bílkovinných produktů vylučovaných hybridomy, popřípadě myelomovými buňkami.

Nedostatky bílkovinných suplementů odstraňuje suplement podle vynálezu, který je tvořen nejméně jednou vodorozpustnou sloučeninou železa, například síranem železnatým, citronanem železitým, chloridem železitým nebo ferikyanidem draselným.

Suplement dále může obsahovat 2×10^{-4} až 1×10^2 mg sloučeniny stopových biogenních prvků, 1×10^{-1} až 5×10^3 mg kyseliny askorbové, 1×10^{-5} až 5×10^{-1} mg steroidní látky a 1×10^{-2} až $7,5 \times 10^2$ mg aminů na 1 mmol vodorozpustných sloučenin železa.

Suplement se přidává do kultivačního média v množství odpovídajícím výsledné koncentraci 2×10^{-5} až 10^{-2} molů vodorozpustné sloučeniny železa na 1 l kultivačního média.

Bylo totiž zjištěno, že jedinou nepostradatelnou složkou bílkovinných suplementů je transferin (Kovář J., Franěk F., *Methods in Enzymology* 121: 277, 1986). Transferin funguje jako přenašeč železa z kultivačního prostředí do buňky. Jeho funkci lze nahradit přítomností vodorozpustné sloučeniny železa vyšší koncentraci.

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., Rhyner K., Castagnola J., To D., Mendelsohn J., *J. Clin. Invest.*, 75: 1061, 1985) použila jako náhradu transferinu vodorozpustné sloučeniny železa v koncentracích 1×10^{-6} až 20×10^{-6} mol/l. Tyto koncentrace jsou však v případě hybridomů a myelomových buněk nedostatečné.

Bylo zjištěno, že sloučeniny železa v koncentraci vyšší než 2×10^{-5} mol/l umožňují růst hybridomů a myelomových buněk a nejsou pro hybridomy a myelomové buňky toxické až do koncentrace 1×10^{-3} mol/l.

Výhodou náhrady bílkovinných suplementů suplementem podle vynálezu je podstatné snížení ceny kultivačního média a snadná izolace bílkovinných produktů vyloučených hybridomy nebo myelomovými buňkami, neboť jsou jedinou bílkovinou nacházející se po kultivaci v kultivačním médiu.

Použití vodorozpustných sloučenin železa podle vynálezu je dokumentováno následujícími příklady.

Příklad 1

Kultivační médium obsahovalo jak základní složky RPMI 1640 v němž byl rozpuštěn L-glutamin (300 μ g/ml), N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina ($1,5 \times 10^{-2}$ mol/l), penicilin (100 jednotek/ml), streptomycin (100 μ g/ml) a gentamycin

(40 µg/ml).

Jako suplement obsahovalo kultivační médium 5×10^{-4} mol/l citronanu železitého, 1×10^{-6} mol/l síranu zinečnatého, $2,5 \times 10^{-9}$ mol/l vanadičnanu amonného, $2,5 \times 10^{-10}$ mol/l chloridu cínatého, 2×10^{-7} mol/l křemičitanu sodného, 4×10^{-8} seleničitanu sodného, $2,5 \times 10^{-10}$ síranu nikelnatého, 5×10^{-10} mol/l chloridu manganatého, 5×10^{-10} molybdenanu amonného, 1×10^{-8} mol/l síranu měďnatého, 1×10^{-8} mol/l chloridu kobaltnatého, 5×10^{-8} síranu kademnatého, 5×10^{-9} mol/l hydrokortisonu, 2×10^{-5} mol/l kyseliny askorbové a 2×10^{-5} mol/l ethanolaminu.

V tomto médiu byly kultivovány hybridomy PLV-01 a PGG-05. Po 4 dnech kultivace vzrostl počet buněk z původního počtu 60×10^3 buněk v 1 ml na 819×10^3 buněk/1 ml u hybridomu PLV-01 a na 675×10^3 buněk/1 ml u hybridomu PGG-05.

Koncentrace monoklonální protilátky stanovená s pomocí enzymoimunologického testu založeného na stanovení peroxidasové aktivity a vyjádřená v relativních jednotkách absorbance dosáhla hodnoty $A_{490} = 0,298$ pro hybridom PLV-01 a hodnoty $A_{490} = 1,32$ pro hybridom PGG-05.

Příklad 2

Kultivační médium obsahovalo základní složky stejné jako v příkladu 1. Pro srovnání byl přidán suplement, který obsahoval 5 mg/l transferinu a 10 mg/l insulinu.

V tomto médiu byly kultivovány hybridomy PLV-01 a PGG-05. Po 4 dnech kultivace vzrostl počet buněk z původního počtu 60×10^3 buněk/ml na 706×10^3 buněk a hodnota $A_{490} = 0,310$ u hybridomu PLV-01. U hybridomu PGG-05 vzrostl počet buněk na 731×10^3 a hodnota $A_{490} = 1,26$.

Buňky PLV-01 byly inokulovány v počtu 10×10^3 buněk do 0,1 ml kultivačního média, které obsahovalo základní složky stejné jako v příkladu 1 a jako suplement obsahovalo síran železnatý v koncentraci 5×10^{-5} mol/l. Po 3 dnech kultivace se buňky namnožily na 26×10^3 .

P R Ě D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Suplement kultivačních médií hybridomů a myelomových buněk, vyznačující se tím, že je tvořen nejméně jednou vodorozpustnou sloučeninou železa, výhodně síranem železnatým, citronanem železitým, chloridem železitým nebo ferikyanidem draselným.
2. Suplement podle bodu 1, vyznačující se tím, že obsahuje 2×10^{-4} až 1×10^2 mg sloučenin stopových biogenních prvků, 1×10^{-1} až 5×10^3 mg kyseliny askorbové, 1×10^{-5} až 5×10^{-1} mg steroidních látek a 1×10^{-2} až $7,5 \times 10^2$ mg aminů na 1 mmol vodorozpustných sloučenin železa.