

(19)



VALSTYBINIS PATENTŲ BIURAS

(10) **LT 3149 B**

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patent numeris: **3149**

(51) Int.Cl.⁵: **C12N 5/20,
C12P 21/08**

(21) Paraiškos numeris: **IP137**

(22) Paraiškos padavimo data: **1992 10 16**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1994 05 15**

(45) Patent paskelbimo data: **1995 01 31**

(72) Išradėjas:
Aurelija Žvirblienė, LT
Mykolas Mauricas, LT
Eugenijus Zdanevičius, LT
Vladas Bumelis, LT

(73) Patent savininkas:
Biotechnologijos institutas "Fermentas", Graičiūno g. 8, 2028 Vilnius, LT

(83) Mikroorganizmo deponavimas:
H 0201, Biotechnologijos institutas "Fermentas", LT

(54) Pavadinimas:
Hibridoma, produkaujanti pelės monokloninius antikūnus prieš žmogaus angiogeniną

(57) Referatas:

Šis išradimas yra iš imuninės biotechnologijos srities. Jo esmė - naujos hibridomos sukūrimas ir monokloninių antikūnų prieš žmogaus angiogeniną gavimas.

Hibridoma skiriasi nuo anksčiau aprašytų analogų pagal motininių ląstelių kilmę bei imunizacijos būdą. Monokloniniai antikūnai gali būti pritaikyti angiogenino analizei, valymui ir biologinių funkcijų tyrinėjimui.

Išradimas yra iš imuninės biotechnologijos srities. Jo esmė - naujos hibridomos sukūrimas ir monokloninių antikūnų (MA) prieš angiogeniną gavimas.

- 5 Hibridinių ląstelių linija (hibridoma AG-1) - tai MA prieš žmogaus angiogeniną producentas.

Yra žinomos ląstelių linijos (26-2F ir 51C9),
 10 produkuojančios MA prieš žmogaus angiogeniną (WO 89/00862, A61K39/395, 1989). Kadangi kitų analogų nėra, šios hibridomos laikomos prototipais. Nurodytos hibridomos yra gautos kitų mielominių ląstelių pagrindu - Sp 2/0 ir P3X63, o ascitai išauginti *nu/nu* pelėse, reikalaujančiose ypatingų sąlygų. Be to, hibridomos
 15 51C9 atveju imunizacijai buvo panaudotas sintetinis peptidas 36-46, kas labai apsunkino hibridomos gavimo procesą.

Šio išradimo tikslas - sukurti hibridomą, kuri
 20 produkuoja didelius kiekius specifinių antikūnų prieš žmogaus angiogeniną. Šio tikslo įgyvendinimui pelės buvo imunizuotos rekombinantiniu konjuguotu žmogaus angiogeninu, po to imunizuotų pelių blužnies limfocitai sukryžminti su pelių mieloma NSO/1 pagal Kiolerio ir
 25 Milšteino metodą [Kohler, Milstein, Eur. J. Immunol., 1976, 6, 511-919]. Atlikus hibridinių ląstelių tikrinimą ir klonavimą, buvo gauta hibridoma AG-1.

Hibridoma AG-1 deponuota Biotechnologijos institute
 30 "Fermentas", deponavimo numeris H 0201.

Hibridomą AG-1 apibūdina šie požymiai.

Morfologiniai požymiai. Hibridinės ląstelės yra
 35 sferinės formos, su lygiais kraštais, turi stambų branduolį. Dauginasi suspensijoje, pasižymi silpna adhezija ant stiklo arba plastiko paviršiaus.

Ląstelių kultūros požymiai. Kultivavimo sąlygos standartinės: terpė DMEM su 10 % embrioninio karvių serumo, 2 mM L-gliutamino, 20 mM HEPES buferio, 200 µg/ml gentamicino, auginama 37°C temperatūroje, 5 % CO₂ atmosferoje. Ląstelių auginimui naudojami stiklo arba plastiko indai, persėjama kas 3-4 dienos, persėjimo dozė - 100 tūkst. ląst./ml.

Auginimas gyvūnų organizme. Singeninių pelių BALB/c organizme hibridoma AG-1 100 % atvejų sukelia ascitą, suleidus į pilvo ertmę 1-2 mln. ląstelių. Likus 7-10 dienų iki ląstelių injekcijos, pelės sensibilizuojamos 0,5 ml pristano. Ascitas formuojasi, praėjus 8-12 dienų po hibridinių ląstelių injekcijos.

Kriokonservavimas. Ilgalaikiam saugojimui ląstelės užšaldomos embrioniniame karvių serume su 10 % dimetilsulfoksido. Užšaldymo režimas - 1°C/min. iki -70°C, po to ląstelės perkeliamos į skystą azotą. Atšildymas - vandens vonioje 37°C. Ląstelių gyvybingumas po atšildymo - 70-80 %.

Kontaminacija. Bakterijų ir grybų kultūroje nerasta, mikoplazmos testas neigiamas.

Ląstelių produktyvumas. 3-4 kultivavimo dieną MA sekrecijos lygis terpėje - 15-20 µg/ml, ascite - 7-10 mg/ml. MA produkcija išlieka iki 20 pasažų kultūroje ir iki 5 pasažų ascite.

Produkto charakteristika. Hibridoma AG-1 produkuoja IgG klasės MA, specifiskus žmogaus angiogeninui.

Išradimą iliustruoja šie pavyzdžiai.

1 pavyzdys. Linijos BALB/c pelės imunizuojamos rekombinantiniu žmogaus angiogeninu, konjugotu su

pelės IgG dviejų stadijų gliutaraldehidiniu metodu [Avrameas, Ternyck, Immunochem., 1969, 6, 53-66]. Imunizacija susideda iš 3 injekcijų į pilvo ertmę: pirmų dviejų imunizacijų metu kas 10 dienų suleidžiama po 100 µg konjuguoto angiogenino su pilnu Froindo adjuvantu, paskutinės imunizacijos metu - 50 µg natyvaus angiogenino fiziologiniame tirpale likus 3 dienoms iki hibridizacijos. Hibridizacijai naudojama pelės mieloma NSO/1 logaritminėje augimo fazėje ir imunizuotos pelės blužnies limfocitai. Hibridizacijos agentas - 50 % polietilenglikolio tirpalas DMEM terpėje su 15 % dimetilsulfoksido. Mielomos ir limfocitų ląstelių santykis hibridizacijos metu - 1:5. Hibridinių ląstelių selekcija atliekama HAT terpėje (0,1 mM hipoksantino, 0,4 µM aminopterino, 16 µM timidino). 7-tą parą HAT terpę palaipsniui pakeičiama HT terpe (hipoksantinas, timidinas), o po to - normalia auginimo terpe. Klonai, produkujantys MA prieš angiogeniną, atrenkami netiesioginės imunofermentinės analizės (IFA) metodu. Teigiami hibridai klonuojami didelių praskiedimų metodu, po to padauginami ir injekuojami BALB/c linijos pelėms ascitui sukelti.

2 pavyzdys. Hibridomos AG-1 produkujamų antikūnų specifiškumas nustatomas netiesioginės imunofermentinės analizės (IFA) metodu. Analizė atliekama šiuo būdu. Polistirolinės plokštelės šulinėliuose sorbuojamas antigenas (10 µg/ml antigeno 100 µl karbonatinio buferio, pH 9,5), inkubuojant per naktį 4°C temperatūroje, po to šulinėliai blokuojami 1 % jaučio serumo albumino tirpalu ir atplaunami distiliuotu vandeniu. Testuojamoji terpė arba ascitinis skystis skiedžiami fosfatiniu buferiu (pH 7,5) su 0,05 % detergento Tween-20, šis tirpalas inkubuojamas plokštelėje 1 val. kambario temperatūroje. Paskutinėje stadijoje į kiekvieną plokštelės šulinėlį įpilama triušio antikūnų prieš pelės Ig, konjuguotų su krienu

peroksidaze. Po inkubacijos (1 val. kamb. temp.) ir atplovimo išryškinama fermentinė reakcija: į šulinėlius įpilama po 100 µl substrato - 5 mg/ml o-fenilendiamino ir 0,03 % vandenilio peroksido Na-acetatiname buferyje, pH 5,5. Išryškėjus spalvai (po 10-15 min.) reakcija sustabdoma, pridedant po 50 µl 10 % sieros rūgšties tirpalo. Optinis tankis matuojamas fotometru Titertek Multiscan ("Flow"), esant bangos ilgiui 492 nm. Netiesioginės IFA rezultatai pateikiami 1 lentelėje. Jie parodo, kad tiriamieji MA reaguoja tik su žmogaus angiogeninu.

1 lentelė. Hibridomos AG-1 produkujamų antikūnų specifiškumas.

Antigenai: įvairūs žmogaus baltymai	Hibridomos AG-1 aug. terpė	Ascito titras
Albuminas	-	500
Angiogeninas	+	80000
α-Auglių nekrozės faktorius	-	500
γ-Interferonas	-	500
Ribonukleazė A	-	500

Hibridoma AG-1 skiriasi nuo ląstelių linijų 26-2F ir 51C9 pagal šiuos požymius: 1) ji gauta kitų motininų ląstelių - mielomos NSO/1 - pagrindu, 2) auginama BALB/c linijos pelėse, atsparesnėse negu pelės nu/nu, todėl gaunamas didelis kiekis MA, 3) hibridomos gavimui panaudota paprasta ir efektyvi imunizacijos schema - konjuguotas su pelės Ig angiogeninas, o tai leido išvengti angiogenino biologinio poveikio ir sustiprinti jo imunogenines savybes.

Hibridomos AG-1 produkujami MA gali būti panaudojami žmogaus angiogenino analizei, valymui ir biologinių funkcijų tyrinėjimui.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

Hibridoma, produkuojanti pelės monokloninius antikūnus
prieš žmogaus angiogeniną.