

(11) Patento numeris: **3150**

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

(21) Paraiškos numeris: **IP138**

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

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

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

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

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

(83) Mikroorganizmo deponavimas:  
**H 0403, Biotechnologijos institutas "Fermentas", LT**

---

(54) Pavadinimas:  
**Hibridoma, produkuojanti pelės monokloninius antikūnus prieš insuliną**

(57) Referatas:

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

Hibridoma skiriasi nuo anksčiau aprašytų analogų pagal produkuojamų monokloninių antikūnų specifiškumą ir imunizacijos būdą. Monokloniniai antikūnai gali būti pritaikyti insulino biotechnologijoje.

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

- 5 Hibridinių ląstelių linija (hibridoma IP-C2) - tai MA prieš insuliną producentas.

Hibridomos IP-C2 analogais laikomos hibridinių ląstelių linijos, produkuojančios MA prieš žmogaus insuliną (JI-2), kiaulės ir jaučio insuliną (JI-1) (EP 0179576), žmogaus ir kiaulės insuliną (IN-04) (CS 240846), žmogaus ir kiaulės insuliną, silpnai reaguojančius su jaučio insulinu (5H-1B-10B) (SU 1595903). Hibridoma, produkuojanti MA prieš antigeninę determinantę, bendrą žmogaus, kiaulės ir jaučio insulinui ir proinsulinui, nėra aprašyta. Be to, minėtos hibridomos buvo gautos, imunizavus peles natyviu insulinu, tuo tarpu kai hibridoma IP-C2-konjuguotu jaučio proinsulinu.

Šio išradimo tikslas - sukurti hibridomą, kuri produkuoja specifinius antikūnus prieš insuliną. tam tikslui pelės buvo imunizuotos konjuguotu jaučio proinsulinu, po to imunizuotų pelių blužnies limfocitai sukryžminti su pelių mieloma NSO/1 pagal Kiolerio ir Milšteino metodą [Kohler, Milstein, Eur. J. Immunol., 1976, 6, 511-919]. Atlikus hibridinių ląstelių tikrinimą ir klonavimą, buvo gauta hibridoma IP-C2.

Hibridoma IP-C2 deponuota Biotechnologijos institute "Fermentas", deponavimo numeris H 0403.

- 30 Hibridomą IP-C2 apibūdina šie požymiai.

**Morfologiniai požymiai.** Hibridinės ląstelės yra 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 % CO<sub>2</sub> 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 IP-C2 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 IP-C2 produkuoja IgG klasės, IgG1 poklasio MA, specifiskus insulinui.

Išradimą iliustruoja šie pavyzdžiai.

**1 pavyzdys. Hibridomos gavimas.** Linijos *BALB/c* pelės imunizuojamos jaučio proinsulinu ("Novo"), konjugotu

su gliutaro aldehidu. Konjugavimas atliekamas 16 val. 4°C temperatūroje fosfatiname buferyje (pH 7,5) su 1 % gliutaro aldehido. Pelės imunizuojamos 4 kartus, suleidžiant konjuguotą proinsuliną į pilvo ertmę. 5 Pirmos 3 imunizacijos atliekamos kas 14 dienų, suleidžiant kiekvienai pelei po 50 µl proinsulino, suspenduoto pilname Froindo adjuvante. Paskutinės imunizacijos metu, kuri atliekama, likus 3 dienoms iki hibridizacijos, suleidžiama po 50 µl proinsulino 10 fiziologiniame tirpale.

Hibridizacijai naudojama pelių mielomos linija NSO/1 logaritminėje augimo fazėje ir imunizuotos pelės blužnies limfocitai. Hibridizacijos agentas - 50 % polietilenglikolio (PEG-4000) tirpalas DMEM terpėje su 15 % dimetilsulfoksido, mielomos ir blužnies ląstelių santykis hibridizacijos metu - 1:5. Hibridizacija vykdoma 1 min., po to ląstelės atplaunamos nuo PEG beserumine DMEM terpe, centrifuguojamos, suspenduojamos 20 HAT terpėje ir išsėjamos į plokšteles, po 10<sup>5</sup> ląstelių į šulinėlį. Prieš tai plokštelėse pasodinami makrofagai iš pelės pilvo ertmės Hibridinių ląstelių selekcija atliekama HAT terpėje, kuri 7-tą kultivavimo dieną palaipsniui keičiama HT terpe (hipoksantinas, 25 timidinas), o po to - normalia kultivavimo terpe su dviguba serumo koncentracija (20 %). Hibridiniai producentai klonuojami didelių praskiedimų metodu, išsėjant po 1 ląstelę į šulinėlį. Atrinkti klonai padauginami ir toliau auginami pelių BALB/c pilvo 30 ertmėje, kur formuojasi ascitas.

**2 pavyzdys. MA specifiškumo tikrinimas.** Naudojamas netiesioginės imunofermentinės analizės (IFA) metodas. Plokštelėse sorbuojami antigenai (žmogaus, kiaulės ir 35 jaučio insulinas ir proinsulinas): į šulinėlius įpilama po 0,5 µg atitinkamo antigeno 100 µl 0,05 M Na-karbonatinio buferio (pH 9,5) ir inkubuojama 16 val.

4°C temperatūroje. Po to plokštelės šulinėliai blokuojami 1 % albumino tirpalu, atplaunami vandeniu ir užpildomi 100 µl hibridomos IP-C2 auginimo terpės arba atskiesto ascitinio skysčio. Po inkubacijos (1 val. kambario temperatūroje) ir atplovimo į šulinėlius įpilama po 100 µl triušio antikūnų prieš pelės imunoglobulinus, konjuguotų su krienų peroksidaze. Po inkubacijos (30 min. kambario temperatūroje) ir atplovimo išryškinama fermentinė reakcija: į šulinėlius įpilama po 100 µl o-fenilendiamino tirpalo (0,5 mg/ml) 0,05 M Na-acetatiname buferyje (pH 5,5) su 0,03 % vandenilio peroksido. Reakcija sustabdoma po 10-15 min., pridedant po 50 µl 10 % sieros rūgšties. Optinis tankis matuojamas fotometru *Titertek Multiscan* ("Flow"), esant bangos ilgiui 492 nm. Šulinėliuose su imobilizuotu insulinu ir proinsulinu optinis tankis viršijo 2 opt. vnt., šulinėliuose su imobilizuotu albuminu ir jaučio C-peptidu - buvo mažesnis nei 0,3 opt. vnt. Analizės rezultatai pateikiami 1 lentelėje.

**1 lentelė.** Hibridomos IP-C2 produktojamų MA specifiškumas

| Antigenas            | Hibridomos IP-C2<br>augin. terpė | Ascito titras |
|----------------------|----------------------------------|---------------|
| Albuminas            | -                                | 400           |
| Žmogaus insulinas    | +                                | 60000         |
| Kiaulės insulinas    | +                                | 60000         |
| Jaučio insulinas     | +                                | 60000         |
| Kiaulės proinsulinas | +                                | 60000         |
| Jaučio proinsulinas  | +                                | 60000         |
| Žmogaus proinsulinas | +                                | 60000         |
| Jaučio C-peptidas    | -                                | 400           |

**3 pavyzdys. Insulino nustatymas konkurentinės IFA metodu.** Plokštelės šulinėliuose sorbuojami MA IP-C2 (po 1 µg į šulinėlį). Po blokavimo ir atplovimo (žr. 2

pvz.) į šulinėlius įpilama po 100 µl standartinio insulino tirpalo arba tiriamo tirpalo, atskiesto fosfatiniu buferiu su 0,05 % detergento Tween-20. Insulino koncentracija standartiniame tirpale - 2 µg/ml. Kalibracinei kreivei padaromi keli standartinio tirpalo skiedimai. Po inkubacijos (30 min. kambario temperatūroje) į visus šulinėlius su insulinu pridedama po 10 µl konjugato - insulino, konjuguoto su krienų peroksidaze. Inkubuojama 1 val. kambario temperatūroje. Po to plokštelė atplaunama ir išryškinama fermentinė reakcija, kaip nurodyta aukščiau (žr. 2 pvz.). Pagal konkurentinės analizės rezultatus braižoma kalibracinė kreivė - optinio tankio priklausomybė nuo insulino koncentracijos standartiniame tirpale. Insulino koncentracija tiriamajame tirpale nustatoma pagal tiesinę kalibracinio grafiko dalį. Metodo jautrumas - 2 ng/ml insulino. Metodas gali būti panaudotas technologinio proceso kontrolei, gaminant kiaulės arba jaučio insuliną, o taip pat rekombinantinį žmogaus insuliną.

Hibridoma IP-C2 skiriasi nuo anksčiau aprašytų analogų (ląstelių linijų IN-04, JI-1, JI-2, 5H-1B-10ū) tuo, kad ji produkuoja kitokio specifiškumo antikūnus - prieš antigeninę determinantę, bendrą žmogaus, kiaulės ir jaučio insulinui, tuo tarpu kai visos minėtos hibridomos - antikūnus su siauru specifiškumu. Todėl antikūnai IP-C2 yra universalus instrumentas šių rūšių insulinams, plačiai naudojamiems medicinoje. Be to, gaunant hibridomą IP-C2 buvo panaudota efektyvesnė imunizacijos schema (konjuguotas proinsulinas), todėl antigenas nesukėlė hipoglikeminio šoko imunizuojamiems gyvūnams.

Hibridomos IP-C2 produkuojami antikūnai gali būti pritaikyti insulino biotechnologijoje.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

Hibridoma, produkuojanti pelės monokloninius antikūnus prieš insulina.