



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **87673**

(13) **U**

(51) МПК

C12N 5/12 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2013 11550**

(22) Дата подання заявки: **30.09.2013**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.02.2014**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.02.2014, Бюл.№ 3**

(72) Винахідник(и):

**Єфетов Костянтин Олександрович (UA),
Паршкова Катерина Володимирівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "КРИМСЬКИЙ
ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ С.І. ГЕОРГІЄВСЬКОГО",
бульвар Леніна, 5/7, м. Сімферополь, 95006
(UA)**

(74) Представник:

**Плотнікова Марина Анатоліївна, реєстр.
№290**

(54) СПОСІБ КЛОНУВАННЯ ГІБРИДОМ

(57) Реферат:

Спосіб клонування гібридом полягає у візуально контрольованому відборі клітин і перенесенні їх в живильне середовище для подальшого культивування. Крім цього, після злиття та вибору об'єктів клонування під візуальним контролем гібридомні клітини чітко відмежованого клону піпетковим мікродозатором з насадкою, що має тонку довгу носову частину, після чого клітини переносять у свіже живильне середовище для подальшого культивування.

UA 87673 U

Корисна модель стосується біотехнології та може бути використана при отриманні клонів клітин.

При отриманні гібридом, що продукують моноклональні антитіла, важливе значення має етап клонування, без якого не можна обійтися. Після злиття гібридомних клітин і елімінації вихідних лімфоцитів і клітин мієломи в лунках планшета, де знаходяться клітини гібридами, можливе виявлення сумішей клітин різних клонів, продукуючих моноклональні антитіла, а також непродукуючих клітин. Якщо не відокремити продукуючі клітини від тих, що не продукують, то останні, розмножуючись швидше (оскільки не витрачають енергію на синтез антитіл), дадуть набагато більше клітин-нащадків у порівнянні з необхідними продукуючими клітинами, останні ж можуть загинути від нестачі живильних речовин. Із суміші продукуючих клітин також важливо виділити клітини одного клону, щоб можна було отримати препарат одного моноклонального антитіла, а не суміш різних моноклональних антитіл. Таким чином, суть клонування полягає в отриманні культури клітин, що походить з однієї материнської клітини, тобто одного клону ідентичних клітин, що продукують моноклональні антитіла одного типу.

Як прототип вибраний спосіб клонування гібридом (Кенет Р.Г. Клонирование в полужидком агаре / Ред. Р.Р. Кенет, Т. Дж. Мак-Керн, Д.Б. Бехтол; пер. с англ. Е.Д. Айнгорн // Моноклональные антитела. Гибридомы: новый уровень биологического анализа. - М.: Медицина, 1983. - С. 372-374), який полягає в створенні рівномірної суспензії клітин гібридами в живильному середовищі з легкоплавким агаром при температурі 41 °С (коли агар ще рідкий, а клітини гібридами зберігають життєздатність), через 2 тижні колонії, що з'явилися, відбирають пастерівською піпеткою та переносять у нове живильне середовище для подальшого культивування.

Ознаками, які співпадають із суттєвими ознаками способу, що заявляється, є: візуально контрольований відбір клітин і перенесення їх в живильне середовище для подальшого культивування.

Технічним результатом корисної моделі є: отримання в найкоротші терміни після злиття стабільних клонів гібридом, що продукують моноклональні антитіла, з мінімальними витратами часу на клонування та без ризику втрати цінних клонів чи зниження їхньої продуктивності.

Причинами, що перешкоджають досягненню очікуваного технічного результату є: труднощі при виборі відповідного легкоплавкого агару (більшість агарів, що випускаються, при температурі 41 °С залишаються твердими), необхідність підтримки постійної температури весь період змішування, дуже вузький (в межах 1-2 °С) інтервал допустимих коливань температури при змішуванні, що робить вельми вірогідною втрату культури, оскільки при нижчій температурі агар застигає нерівномірно, а при вищій - гинуть клітини.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення способу-прототипу шляхом раннього прицільного забору клітин з використанням піпеткового мікродозатора, що дозволяє мінімізувати ризик втрати цінного клону, зменшити матеріальні витрати та скоротити терміни здобуття стабільних гібридомних клітин, що продукують моноклональні антитіла, тобто досягти очікуваного технічного результату.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі клонування гібридом, що полягає у візуально контрольованому відборі клітин і перенесенні їх в живильне середовище для подальшого культивування, згідно корисної моделі, після злиття та вибору об'єктів клонування під візуальним контролем прицільно відбирають гібридомні клітини чітко відмежованого клону піпетковим мікродозатором з насадкою, що має тонку довгу носову частину, після чого клітини переносять у свіже живильне середовище для подальшого культивування.

Між сукупністю суттєвих ознак запропонованої корисної моделі та очікуваним технічним результатом, проявляється наступний причинно-наслідковий зв'язок: здійснення раннього прицільного відбору клітин, коли клони, що розмножуються в одній лунці планшета ще не злилися, дозволяє швидко отримати стабільні продукуючі клони, а вірогідна в процесі багаторазового реклонування втрата цінного клону практично виключається, використання для відбору клітин піпеткового мікродозатора з насадками, що витримують стерилізацію, зручні в роботі та можуть бути легко і швидко виготовлені, також дозволяє мінімізувати витрати часу та коштів на клонування.

Запропонований спосіб клонування гібридом полягає в наступному.

Після злиття гібридами, виявлення гібридомних клонів і вибору об'єктів клонування під візуальним контролем шляхом використання інвертованого мікроскопа здійснюють прицільний забір клітин з центральної частини чітко відмежованого клону за допомогою піпеткового мікродозатора із заздалегідь простерилізованою насадкою, що має тонку довгу носову частину. Клітини переносять до лунки іншого планшета зі свіжим живильним середовищем і живлячими

клітинами. За наявності в одній лунці декількох клонів, відбір клітин кожного з них проводять окремо з використанням нової насадки.

Можливість використання корисної моделі підтверджується наступним прикладом.

Приклад.

5 В процесі отримання мишачих гібридом, продукуючих моноклональні антитіла до ліпофоруину з гемолімфи *Adscita geryon* (Insecta), через 9 днів після злиття гібридні клітини клонів, вибраних у результаті імунологічного тестування, були прицільно відібрані запропонованим способом і перенесені в лунки нових планшетів із живильним середовищем.

10 В одному випадку з однієї лунки з трьома окремо розташованими клонами перенесення клітин кожного з клонів здійснювали в різні лунки з використанням нової стерильної насадки для кожного з клонів.

Наявність необхідної імунної відповіді було підтверджено імуноферментним аналізом через 7 днів після клонування.

15 В жодному випадку не виникла необхідність в реклонуванні, не спостерігалися загибель клону, зниження чи втрата продуктивності.

В результаті клонування запропонованим способом у найкоротші терміни було отримано чотири штами гібридомних клітин, що стабільно продукують необхідні моноклональні антитіла до різних антигенних детермінант ліпофоруину.

20 Використання запропонованого способу дозволяє здійснювати клонування у найкоротші терміни після злиття гібридомних клітин. У разі наявності в одних і тих лунках планшету клітин різних відмежованих гібридних клонів, спосіб дозволяє швидко та ефективно відокремити клітини клонів, що продукують різні моноклональні антитіла, або продукуючі клітини від тих, що не продукують, при цьому практично виключається втрата цінного клону, зникає необхідність в реклонуванні, а продуктивність отриманих гібридом зберігається.

25 Даний спосіб мінімізує витрати часу на клонування, а крім того, не вимагає додаткових матеріальних витрат і вживання складної апаратури у порівнянні зі способом-прототипом.

Спосіб, що заявляється, є простим і зручним, легко здійснюється в умовах біотехнологічної лабораторії.

30

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб клонування гібридом, що полягає у візуально контрольованому відборі клітин і перенесенні їх в живильне середовище для подальшого культивування, який **відрізняється** тим, що після злиття та вибору об'єктів клонування під візуальним контролем гібридомні клітини чітко відмежованого клону піпетковим мікродозатором з насадкою, що має тонку довгу носову частину, після чого клітини переносять у свіже живильне середовище для подальшого культивування.

35

Комп'ютерна верстка І. Мироненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601