



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

244 396

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 06 11 84
(21) PV 8436-84

(51) Int. Cl. 4
C 12 N 15/00

(40) Zveřejněno 17 09 85

(45) Vydáno 01 06 88

(75)
Autor vynálezu

HILGERT IVAN RNDr., CSc.; HOŘEJŠÍ VACLAV, RNDr., CSc.;
KRIŠTOFOVÁ HANA RNDr., PRAHA

(54)

Myší lymfocytární hybridom IMG + CZAS + MEM - 32

Řešení se týká myšího lymfocytárního hybridomu, produkujícího protilátku proti membránovému antigenu lidských T buněk, uloženého ve sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV pod označením MEM - 32. Samotná monoklonální protilátka hybridomu MEM-32 je vhodná pro použití v enzymoimunologické analýze lidských T buněk.

Vynález se týká nového hybridomu, tj. hybridního jednobuněčného organismu, sestaveného fúzí buňky myši myelomové linie Sp2/O-Ag14 a myši slezinové lymfoidní buňky, produkující protilátku proti membránovému antigenu přítomnému na lidských T buňkách (tj. T lymfocytech). T buňky mají základní důležitost v imunitním systému. Počet T buněk a jejich poměr k B lymfocytům se při imunodeficiencích a jiných patologických stavech liší od fyziologické normy.

Doposud se protilátky proti membránovým antigenům vyrábějí tak, že buněčné suspenze nebo membránové frakce jsou opakovaně injikovány produkčním zvířatům, nejčastěji králíkům. Sérum takto imunizovaných zvířat, odebírané po určité době působení antigenu, slouží jako zdroj protilátek. Takto jsou například připravovány protilátky proti thymocytům, které jsou používány k imunosupresi při transplantaci orgánů v klinické medicíně. Tento postup, nazývaný konvenční imunizací, má neodstranitelnou nevýhodu v tom, že séra obsahují protilátky proti mnoha membránovým antigenům, z nichž některé jsou přítomny na více typech buněk; séra proto nelze použít k jemnému rozlišení buněčných typů a tříd.

Nevýhody konvenčních sér proti membránovým antigenům v principu odstraňuje použití hybridomové technologie. Produkt hybridomu -monoklonální protilátka - je zaměřena vždy proti jediné antigenní determinantě. Je-li konstruován dostatečně velký soubor hybridomů, je pravděpodobné, že se z něho podaří vyhledat hybridom syntetizující protilátku, která rozeznává antigenní determinantu charakterizující určitý typ nebo třídu či podtřídu lymfocytů.

Dosud se obvykle počet T buněk zjišťoval tzv. rosetovým testem s ovčími erythrocyty. Podle publikovaných výsledků (Kung, P.C., Talle, M.A., DeMaria, M.E., Butler, M.S., Lifter, J., Goldstein, G.: Strategies for generating monoclonal anti-

bodies defining human T-lymphocyte differentiation antigens. Transplant. Proc. 12, Suppl. 1:141-146, 1980) se dá soudit, že lze připravit monoklonální protilátky specificky detegující T lymfocyty, které by mohly nahradit dosud používaný rosetový test.

Podstatného pokroku v diagnostice lidských lymfocytů, projevujícího se vyšší spolehlivostí analytického výsledku, se dosáhne, je-li k dispozici hybridom, produkující monoklonální protilátku proti antigenu přítomnému na lidských T buňkách, uložený ve Sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV v Praze 4, Vídeňská č. 1083, pod označením IMG CZAS MEM-32.

Uvedený hybridom byl získán způsobem známým z odborné literatury (Fazekas de St. Groth, S., Scheidegger, D.: Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics, J. Immunol. Meth., 35:1-21, 1980; Galfré, G., Howe, S.C., Milstein, C., Butcher, G.W., Howard, J.C.: Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines, Nature, 266:550, 1977) klonováním souboru hybridních buněk, získaných ze sleziny myši kmene BALB/c imunizovaných membránovou frakcí buněk lidských thymů.

Výhodou hybridomu je, že produkuje homogenní protilátku monoklonální, která je schopna specificky reagovat s lidskými T buňkami. Hybridom MEM-32 je možné kultivovat in vitro v médiích vhodných pro živočišné buňky a je adaptován pro růst in vivo v peritoneální dutině myši kmene BALB/c. Z konserv, uchovávaných v kapalném dusíku, je možné zahájit produkci protilátky bez dalšího antigenu. Protilátka, produkovaná hybridomem MEM-32, reaguje specificky s populací lidských T buněk a není třeba se zbavovat protilátek balastních.

Příklad

244 396

Za účelem pomnožení hybridomových buněk *in vivo* bylo aplikováno 4×10^6 buněk do peritoneální dutiny myši. Aby došlo k lepšímu uchycení aplikovaných buněk, byla myš 14 dní před přenosem buněk hybridomu ovlivněna parafinovým olejem (0,5 ml intreperitoneálně). Po 10 dnech růstu hybridomu v peritoneální dutině byla myš uhubena a naprodukováná ascitická tekutina odebrána. Celkem bylo získáno 3 ml ascitické tekutiny, která obsahovala 4 mg/ml imunoglobulinu. Monoklonální protilátka reagovala specificky s T buňkami periferní krve v nepřímém enzymoimunologickém testu. Monocyty, granulocyty a erythrocyty s protilátkou nereagovaly. Při použití čištěných populací T a B lymfocytů byla zjištěna reaktivita protilátky MEM-32 s více než 95% T buněk a s méně než 5% B buněk. Specifická protilátka je identická s komerční monoklonální protilátkou OKT-1, jak bylo prokázáno opakovanými paralelními stanoveními včetně použití směsí obou protilátek, a to jak v případě směsi periferních lymfocytů, tak u izolovaných T a B populací (viz tabulka).

Tab. Reaktivita protilátek produkovaných hybridomem MEM-32 a OKT-1¹ s buňkami periferní krve

Buňky periferní lidské krve ²	% pozitivních buněk reagujících s mono- klonální protilátkou v enzymoimunologickém testu ³		
	MEM-32	OKT1	směs MEM-32 + OKT1
lymfocyty	70-80	70-80	70-80
T lymfocyty ⁴	>95	>95	>95
B lymfocyty ⁵	<5	<5	<5
monocyty	<1	<1	<1
granulocyty	<1	<1	<1
erythrocyty	<1	<1	<1

¹Komerční monoklonální protilátka od firmy Ortho Pharmaceutical Corporation, Raritan, New Jersey, USA.

²Buňky lidské periferní krve byly izolovány popsanou metodou

(Bøyum, A.: Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. Scand.J.Immunol. 5, Suppl. 5:9, 1976) na Verografin-Ficoll gradientu.

³Byl použit mírně modifikovaný postup podle práce Lansdorp, P.M., Astaldi, G.C.B., Oosterhof, F., Janssen, M.C., Zeijlemaker, W.P.: Immunoperoxidase procedures to detect monoclonal antibodies against cell surface antigen. Quantitation of binding and staining of individual cells. J. Immunol.Meth. 39:393-405, 1980.

⁴T lymfocyty byly izolovány průchodem směsi lymfocytů sloupečkem nylonové vaty popsanou metodou (Julius, M.H., Simpson, E., Herzenberg, L.A.: A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. Europ.J. Immunol. 3:645-649, 1971).

⁵B lymfocyty byly izolovány specifickou adsorbci na plastické desky pokryté protilátkou proti lidskému imunoglobulinu popsanou metodou (Mage, M.G., McHugh, L.L., Rothstein, T.L.: Mouse lymphocytes with and without surface immunoglobulin: Preparative scale separation in polystyrene tissue culture dishes coated with specifically purified anti-immunoglobulin. J.Immunol.Meth. 15:47-56, 1977).

Identita antigenů rozeznávaných protilátkami MEM32 a OKT-1 byla prokázána izolací příslušného antigenu imunoafinitní chromatografií na imobilizované protilátce MEM-32 a demonstrací silné reaktivity tohoto antigenu s protilátkou OKT-1. Tento průkaz byl proveden následovně: Částečně vyčištěná protilátka MEM-32 byla navázána na CNBr-Sepharosu 4B (Pharmacia, Uppsala, Švédsko) (5 mg/ml). Hrubá membránová frakce z lidských thymocytů byla solubilizována v roztoku obsahujícím 1% detergent NP-40 a získaný extrakt byl nanesen na kolonku Sepharosu 4B s kovalentně navázanou protilátkou MEM-32. Po důkladném promytí byl specificky adsorbovaný antigen vymyt roztokem 2% dodecylsulfátu sodného a získaný vzorek analyzován elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítom-

nosti SDS. Po skončení elektroforézy byly separované proteiny elektroforeticky převedeny na nitrocelulosovou membránu (Towbin, H., Stachelin, T., Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc.Natl.Acad.Sci. U.S. 76: 4350-4354, 1979) a detegovány nepřímým enzymoimunologickým testem s využitím příslušné monoklonální protilátky a prasečí antitýší protilátky konjugované s peroxidázou (ÚSOL, Praha). Jak protilátka MEM-32, tak OKT-1 reagovaly silně s izolovaným antigenem (m.h. 67 000).

Buňky hybridomu MEM-32 mají ultrastrukturní obraz typických myelomových buněk. Cytoplazma obsahuje velké množství polyribosomů, mitochondrie a slabě vyvinuté endoplasmatické retikulum. In vitro rostou jako polosuspenní kultury. Základním kultivačním médiem je Eaglovo minimální esenciální médium s Hanksovou solnou směsí doplněné o neesenciální aminokyseliny, L-glutamin (3mM), pyruvát sodný (1mM). Toto médium (označované jako H-MEMd, Ústav molekulární genetiky ČSAV) je pro kultivaci hybridomu MEM-32 doplněno penicilinem, streptomycinem, gentamycinem, 2-merkaptotetanolem (0,05 mM), pufrům HEPES (10 mM) a inaktivovaným bovinním sérem (Bioveta, Ivanovice na Hané, 10%). Hybridom je kultivován při 37°C. Střední generační čas je 21 hod. a 5 měsíců po sestrojení byl modální počet chromozomů 92. Produkovaná protilátka je monoklonální imunoglobulin podtřídy IgG1 s lehkými řetězci typu kapa, její izoelektrický bod je pH 6.0 - 6.4.

Monoklonální protilátka produkovaná hybridomem MEM-32 reaguje specificky s lidskými T buňkami. Hybridom MEM-32 může být průmyslově využíván jako zdroj monoklonální protilátky proti T buňkám v analytických metodách. Monoklonální protilátka hybridomu MEM-32 může být využita pro stanovení T buněk v periferní krvi a lymfatických orgánech při klinické diagnostice v zdravotnických zařízeních, zvláště při různých imunologických nedostatečnostech a autoimunních onemocněních a pro klasifikaci leukémií T buněčného původu.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

244 396

Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS MEM-32 produ-
kující monoklonální protilátku podtřídy IgG1 proti mem-
bránovému antigenu lidských T buněk.