



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

229 996

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 08 04 83
(21) PV 2543-83

(51) Int. Cl.³

C 12 N 5/00

(40) Zveřejněno 28 10 83
(45) Vydáno 01 02 86

(75)
Autor vynálezu

NĚMEC MILOŠ RNDr. CSc., VIKLICKÝ VLADIMÍR MUDr. CSc.,
BÁRTEK JIŘÍ MUDr., PRAHA, DŘÍMALOVÁ DAGMAR MUDr.,
VAŇÁK JAN MUDr., OLMOUC

(54)

Myší lymfocytární hybridom

Vynález se týká myšího lymfocytárního hybridomu, produkujícího protilátku proti lidskému erytrocytárnímu skupinovému antigenu A, uloženého ve sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV pod označením HE-18. Samotná monoklonální protilátka hybridomu HE-18 je vhodná pro odlišení lidského erytrocytárního antigenu podskupiny A1B od antigenu podskupiny A2B ve zdravotnické praxi.

Vynález se týká nového hybridomu, tj. hybridního jednobuněčného organismu, sestrojeného fúzí buňky myší myelomové linie P3-X63-Ag8.653 a myší slezinné lymfoidní buňky, produkující protilátku proti lidskému erytrocytárnímu skupinovému antigenu A.

Diagnostická séra proti lidskému erytrocytárnímu skupinovému antigenu A /zkráceně diagnostická séra anti-A/ jsou základní složkou souborů diagnostických sér sloužících k určení skupinové příslušnosti lidských erytrocytů v systému ABO. Vyšetřování skupinové příslušnosti v systému ABO je základním a nejčastějším sérologickým vyšetřením v humánní hematologické a transfúzní praxi. Provádí se např. jako základní součást úplného předtransfúzního vyšetření, kontroly krevní skupiny u lůžka při začátku krevní transfúze, sérologických vyšetřování při potransfúzních příhodách, předporodního vyšetřování rodiček a vyšetřování novorozenců.

Diagnostická séra anti-A se dosud připravují z lidské krve vybraných dárců, u nichž byly předem prokázány přirozené vysoké hodnoty aglutininů anti-A nebo z krve dobrovolných dárců záměrně imunizovaných slinami vylučovatelů skupinově specifické substance A, příp. substancí A připravenou z lidských slin nebo zvířecího materiálu - např. žaludeční mukózy prasat či koní. Substance užívané k imunizaci lidských dobrovolníků je nezbytné podrobit státní kontrole sterility, neškodnosti a účinnosti. Protože koncentrace žádaných protilátek v séru klesá po imunizaci s časem, je nutné provádět imunizaci opakovaně. Imunizace dobrovolníků izolovanými substancemi mohou být provázeny nepříznivými projevy, jimž lze předcházet pouze desenzibilizací imunizovaných jedinců. Dosud užívaný způsob přípravy diagnostických sér anti-A klade tedy značné nároky na materiální, kádrové, metodické i organizační zajištění výrobního procesu.

Vedle žádaných protilátek anti-A se v séru každého záměrně imunizovaného i neimunizovaného dárce, jehož organismus je nepřetržitě vystaven nejrozličnějším antigenním podnětům, vyskytují v heterogenní - složení vždy jedinečné a neopakovatelné - směsi mnohé další protilátky, z nichž některé přímo ovlivňují reakci séra s erytrocyty a znehodnocují diagnostickou účinnost získaného séra. Takové protilátky je nezbytné ze séra odstranit. Standardizace jednotlivých šarží diagnostických sér je při stávajícím způsobu přípravy obtížná a vždy neúplná, neboť z vlastní podstaty dosavadní přípravy sér vyplývá nemožnost získat dvě výrobní šarže stejných vlastností. Nepříznivým rysem dosavadního způsobu přípravy diagnostických sér anti-A je spotřeba velkých množství lidské krve.

Při sérologických vyšetřováních s diagnostickými séry anti-A připravenými dosavadním způsobem může být dosaženo chybných výsledků způsobených neočekávanými vlastnostmi diagnostických sér i vyšetřovaných erytrocytů. Četné obtíže a chyby se mohou projevit při odlišování podskupin A_1 a A_2 , příp. A_1B a A_2B a při určování slabých aglutinogenů A.

Mnohé z uvedených problémů dosud používaného postupu přípravy diagnostických lidských sér anti-A i řadu obtíží vyplývajících z nepříznivých vlastností současných diagnostických sér je možné odstranit zavedením přípravy myších monoklonálních protilátek anti-A, produkovaných lymfocytárními hybridomy.

Zdrojem monoklonální protilátky proti lidskému erytrocytárnímu skupinovému antigenu A je hybridom, uložený ve sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV v Praze 4, Vídeňské ul. 1083 pod označením IMG CZAS HE-18.

Uvedený hybridom byl získán způsobem známým z odborné literatury /Fazekas de St. Groth, S., Scheidigger, D.: Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics, J. Immunol. Meth.: 35: 1, 1980; Galfré, G., Howe, S.S., 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, vzniklých fúzí buněk myší myelomové linie P3-X63-Ag8.653 a buněk, získaných ze sleziny myší kmene BALB/c, imunizovaných slinami vylučovatele skupinově specifické substance A.

Lymfocytární hybridom HE-18 produkuje zcela homogenní protilátku, tzv. protilátku monoklonální, která specificky reaguje s lidskými typovými erytrocyty A_1 , A_1B a A_2 a nereaguje s erytrocyty A_2B , B a O. Hybridom HE-18 je možné kultivovat v podmínkách in vitro v kultivačních médiích vhodných pro živočišné buňky nebo v podmínkách in vivo v peritoneální dutině myší kmene BALB/c. Hybridom HE-18 je možné dlouhodobě uchovávat v konzervách uložených v kapalném dusíku. Produkci protilátky je možné zahájit po rozmrazení buněčné konzervy, aniž by bylo třeba dalšího antigenu. Monoklonální protilátka produkovaná hybridomem HE-18 je specifická pro lidský erytrocytární skupinový antigen A a je prostá jakýchkoliv balastních protilátek.

Příklad:

Za účelem pomnožení buněk hybridomu HE-18 v podmínkách in vitro bylo vpraveno 1×10^6 hybridomových buněk do kultivační lahve Legroux obsahující 20 ml kultivačního média H-MEMd. Po třech dnech růstu kultury hybridomových buněk bylo z lahve získáno kultivační médium obohacené o monoklonální protilátku HE-18 uvolňovanou do média hybridomovými buňkami. Účinnost monoklonální protilátky HE-18 byla testována postupným dvojnásobným ředěním kultivačního média obsahujícího monoklonální protilátku v prostředí izotonického roztoku chloridu sodného v aglutinačních zkumavkách podle oborové normy ON 84 3225. Kultivační médium aglutinovalo na /podle ON 84 3225/ erytrocyty A_1 v ředění 1:512, erytrocyty A_1B v ředění 1:256, erytrocyty A_2 v ředění 1:64. S erytrocyty A_2B , B a O kultivační médium obsahující monoklonální protilátku HE-18 nereagovalo.

Buňky hybridomu HE-18 mají ultrastrukturální obraz typických myelomových buněk, kde převažující organelou jsou volné a na membrány vázané polyribosomy. V podmínkách in vitro rostou v podobě polosuspensních kultur. Základním kultivačním médiem je Eaglovo minimální esenciální médium s Hanksovou solnou směsí, doplněné o neesenciální aminokyseliny, L-glutamin /3mM/ a pyruvát sodný /1mM/. Toto médium /označované jako H-MEMd, Ústav molekulární genetiky ČSAV/ je pro kultivaci hybridomu HE-18 doplněno penicilinem, streptomycinem, gentamycinem, 2-merkaptetanolem / 5×10^{-5} M/, pufrům HEPEs / $2-4 \times 10^{-3}$ M/ a inaktivovaným bovinním sérem pro TK /Bioveta n.p., Ivanovice na Hané, 10%/. Pro získání kultivačního média obohaceného o monoklonální protilátku HE-18 /supernatantu kultury hybridomových buněk/ k diagnostickým účelům je v kultivačním médiu nahrazeno inaktivované boviní sérum inaktivovaným fetálním telecím sérem.

Hybridom HE-18 je kultivován při 37°C. Střední generační čas je 17 hodin, modální počet chromosomů 20 měsíců po sestrogení /fúzi/ je 87 chromosomů. Produkováná monoklonální protilátka je myší imunoglobulin třídy IgM.

Monoklonální protilátka produkovaná myším lymfocytárním hybridomem HE-18 může být využita ve zdravotnické praxi k bezpečnému odlišení lidského erytrocytárního antigenu podskupiny A₁B od antigenu podskupiny A₂B.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

229 996

Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS HE-18, produkující monoklonální protilátku třídy IgM proti lidskému erytrocytárnímu skupinovému antigenu A.