



URAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

260749

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 5/00

(22) Přihlášeno 15 06 87
(21) [PV 4358-87.U]

(40) Zveřejněno 16 05 88

(45) Vydáno 15 05 89

(75)

Autor vynálezu

VIKLICKÝ VLADIMÍR MUDr. CSc., PRAHA,
DRÍMALOVÁ DAGMAR MUDr., VAŇÁK JAN MUDr., OLOMOUČ,
NĚMEC MILOŠ RNDr. CSc., PRAHA

(54) Myší lymfocytární hybridom produkující protilátku proti lidskému erytrocytárnímu skupinovému antigenu B

1

2

Řešení se týká myšího lymfocytárního hybridomu, produkujícího protilátku proti lidskému erytrocytárnímu skupinovému antigenu B, uloženého ve sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV pod označením HEB-27. Monoklonální protilátka hybridomu HEB-27 je vhodná jako součást diagnostického panelu obsahujícího také monoklonální protilátky HE-10, HE-14 a HEB-20 k upřesnění patologicko-anatomické diagnózy nádorových onemocnění tenkého a tlustého střeva.

Vynález se týká nového hybridomu, to je hybridního jednobuněčného organismu, sestaveného fúzí buňky myší myelomové linie Sp 2/0 a myší slezinové lymfoidní buňky produkující protilátku proti lidskému erytrocytárnímu skupinovému antigenu B.

Diagnostická séra proti lidskému erytrocytárnímu skupinovému antigenu B (zkráceně diagnostická séra anti-B) 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 například jako základní součást úplného předtransfúzního vyšetření, kontroly krevní skupiny a lůžka při začátku krevní transfúze, sérologických vyšetřování rodiček a vyšetřování novorozenců.

Výskyt antigenů krevně skupinového systému ABO není omezen pouze na erytrocytární membrány. Ve formě glykoproteinů se nacházejí například v sekretech žláзовých buněk gastrointestinálního, genitálního a respiračního traktu. Antigenní sacharidové struktury jsou rovněž součástí buněčných membrán epiteliální tkáně, přičemž pozornost se soustřeďuje na změny v expresi těchto antigenů v souvislosti s vývojovými, diferenciacními a zejména nádorovými procesy. Značný počet imunohistochemických studií prokázal, že například u karcinomů plic, žaludku, prostaty a močového měchýře dochází ke ztrátě A a B isoantigenů, které jsou normálně přítomny ve zdravé epiteliální tkáni.

Krevně skupinové antigeny A a B jsou přítomny také v epiteliálních buňkách sliznice tlustého střeva lidského plodu. Po narození zůstávají zachovány v proximální části, rychle však mizí v distální části tračníku. Krevně skupinové antigeny se znovu objevují u distálně lokalizovaných karcinomů — například v esovité kličce a rektu — a stávají se významným diagnostickým znakem rozvoje nádoru.

Diagnostická séra anti-B se dosud většinou připravují z lidské krve vybraných dárců, u nichž byly předem prokázány přirozeně vysoké hodnoty aglutininů anti-B nebo z krve dobrovolných dárců záměrně imunizovaných slinami vylučovatelů skupinové specifické substance B, případně substancí B 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-B klade tedy značné nároky na materiální, kádrové, metodické i organizační zajištění výrobního procesu.

Vedle žádaných protilátek anti-B se v séru každého záměrně imunizovaného i neimunizovaného dárce, vyskytují v heterogenní — složením 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-B je spotřeba velkých množství lidské krve.

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

Podobné hybridomy produkující protilátky byly připraveny v řadě zemí a v některých z nich jsou již komerčně dostupné a začínají se používat v klinické sérologické praxi.

Jde například o výrobky firem:

Serotec (Anglie),
Immunotech (Francie),
Biotest-Diagnostics (NSR),
Diagnostics Pasteur (Francie),
Celtech (Anglie).

Nabízené protilátky v zahraničí jsou určeny pro sérologické vyšetření krevních skupin. Žádná z uvedených zahraničních firem neuvádí možnost využití nabízených protilátek v imunohistochemii.

Uvedené nevýhody odstraňuje nový hybridom, uložený ve sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV v Praze 4, Vídeňská ul. 1033 pod označením IMG HEB-27, který je zdrojem monoklonální protilátky proti lidskému erytrocytárnímu skupinovému antigenu B.

Uvedený hybridom byl získán způsobem známým z odborné literatury (Fazekas de St. Groth, S., Scheidigger, O.: 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 Sp 2/0 a buněk, získaných ze sleziny myší F1 (BALB/c × B 10.A), imunizovaných erytrocyty skupiny B.

Lymfocytární hybridom HEB-27 produkuje zcela homogenní protilátku, tzv. protilátku monoklonální, specificky reagující s lidskými typovými erytrocyty B, A₁B a A₂B a která nereaguje s erytrocyty A₁, A₂ a O. Hybridom HEB-27 je možné kultivovat v podmínkách in vitro v kultivačních médiích vhodných pro živočišné buňky nebo v podmínkách in vivo v peritoneální dutině myši F₁ (BALB/c X B 10.A). Hybridom HEB-27 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 HEB-27 je specifická pro lidský erytrocytární skupinový antigen B a je prostá jakýchkoliv balastních protilátek.

Příklad

Za účelem pomnožení buněk hybridomu HEB-27 v podmínkách in vitro bylo vpraveno 1×10^6 hybridomových buněk do kultivační láhve Legroux obsahující 20 ml kompletního kultivačního média RPMI s fetálním telecím sérem (10%). Po třech dnech růstu kultury hybridomových buněk bylo z láhve získáno kultivační médium obohacené o monoklonální protilátku HEB-27 uvolňovanou do média hybridomovými buňkami. Účinnost monoklonální protilátky HEB-27

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 B v ředění 1:16, erytrocyty A₁B v ředění 1:16, erytrocyty A₂B v ředění 1:8. S erytrocyty A₁, A₂ a O kultivační médium obsahující monoklonální protilátku HEB-27 nereagovalo.

Pro testování reaktivity protilátky HEB-27 na tkáňových řezech byly bioptické vzorky odebrány z několika míst tlustého střeva, fixovány ve formaldehydu a zality do parafinu. Po odparafinování řezů byla aplikována protilátka HEB-27 (naředěný supernatant) a její vazba na terčové struktury byla sledována pomocí prasečí protilátky proti myšimu imunoglobulinu značená křenovou peroxidázou (Ústav sér a očkovacích látek, Praha). Protilátka HEB-27 výrazně barvila na řezech z normální tkáně difúzně mucinózní buňky krypt s maximem v proximální části tlustého střeva a vymizením pozitivivity v oblasti esovité kličky a konečníku. Pozitivní reakce se projevila v oblasti distálního tračníku pouze ve vzorcích z nádorové tkáně (adenokarcinom sigmoidea). Silná pozitivní reakce byla též pozorována s přítomnými erytrocyty. Výsledky srovnání reaktivity jednotlivých monoklonálních protilátek jsou shrnuty v tabulce.

Tabulka

Reaktivita monoklonálních protilátek v tkáňových řezech¹ pacientů s krevní skupinou B

Monoklonální protilátka	Cílový antigen	Tračník	Distální tračník	Adenokarcinom distálního tračníku
HEB-27	B	+	—	+
HEB-20	B	+	—	+
HE-10	A	—	—	—
HE-14	A	—	—	—

Poznámka:

¹ fixace formolem, zalití do parafinu

V podobě odebraných a zpracovaných vzorcích plicní tkáně byla pozitivní reakce, na rozdíl od protilátky HEB-20, zjištěna ve všech vrstvách epitelu bronchů, v sekretu a ve většině buněk bronchiálních žlázek. Protilátka HEB-27 též značila přítomné erytrocyty.

Buňky hybridomu HEB-27 mají ultrastrukturní obraz typických myelomových buněk, kde převažující organelou jsou volné a na membrány vázané polyribosomy. V podmínkách in vitro rostou v podobě polosuspenních kultur. Základními kultivačními médii jsou RPMI nebo Eaglovo esenciální médium s Hanksovou solnou směsí, doplně-

ná o neesenciální aminokyseliny. L-glutamin (3mM) a pyruvát sodný (1mM) médium označované jako H-MEMd, (Ústav molekulární genetiky ČSAV). Média jsou pro kultivaci hybridomu HEB-27 doplněna penicilinem, streptomycinem, 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 získávání kultivačního média obohaceného o monoklonální protilátku HEB-27 (supernatantu kultury hybridomových buněk) k diagnostickým účelům je v kultivačním médiu nahrazeno inaktivované bovinní sérum fetálním telecím sérem.

Hybridom HEB-27 je kultivován při 37 °C. Střední generační čas je 16,4 hodin; molární počet chromosomů 40 měsíců po sestrojení (fúzi) je 81 chromosomů. Produkovaná monoklonální protilátka je myší imunoglobulin třídy IgM, kappa.

Monoklonální protilátka produkovaná my-

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS HEB-27, produkující monoklonální protilátku

ším lymfocytárním hybridomem HEB-27 může být využita ve zdravotnické praxi jako součást diagnostického panelu obsahujícího také monoklonální protilátky HE-10, HE-14 a HEB-20 k upřesnění patologicko-anatomické diagnózy nádorových onemocnění tenkého a tlustého střeva.

proti lidskému erytrocytárnímu skupinovému antigenu B třídy IgM.