

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

248382

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 15/00

/22/ Přihlášeno 06 06 85
/21/ PV 4064-85

(40) Zveřejněno 16 01 86

(45) Vydáno 16 11 87

(75)

Autor vynálezu

HILGERT IVAN RNDr. CSc., HOŘEJŠÍ VÁCLAV RNDr. CSc.,
BAŽIL VLADIMÍR RNDr., KRIŠTOFOVÁ HANA RNDr., PRAHA

(54) Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS MEM-18

Řešení se týká myšího lymfocytárního hybridomu, produkujícího protilátku proti membránovému antigenu lidských monocytů, uloženého ve sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV pod označením MEM-18. Monoklonální protilátka hybridomu MEM-18 je vhodná pro použití v nepřímé imunofluorescenční a enzymoimunologické analýze lidských monocytů.

Vynález se týká nového hybridomu, tj. hybridního jednobuněčného organismu, sestaveného fúzí buňky myši myelomové linie Sp2/O-Ag14 a myši slezinné lymfoidní buňky, produkující protilátku proti membránovému antigenu přítomnému na lidských monocytech.

Monocyty mají základní důležitost v imunitním systému. Počet monocytů 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 leukocytů.

Dosud se obvykle počet monocytů zjišťoval histologicky a histochemicky. Většina monocytů je morfologicky odlišitelná od ostatních jaderných buněk v krvi, přesto je přednostně používáno histochemických testů.

Podle publikovaných výsledků /Kung, P. C., Talle, M. A., DeMaria, M. E., Butler, M. S., Lifter, J., Goldstein, G.: Strategies for generating monoclonal antibodies defining human T-lymphocyte differentiation antigens. Transplant. Proc. 12, Suppl. 1:141-146, 1980/ se dá soudit, že lze připravit monoklonální protilátka specificky detegující monocyty, která by mohla nahradit dosud používané histochemické techniky.

Podstatného pokroku v diagnostice lidských monocytů projevujícího se vyšší spolehlivostí analytického výsledku, se dosáhne, je-li k dispozici hybridom, produkující monoklonální protilátku proti antigenu přítomnému na lidských monocytech, uložený ve Sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV v Praze 4, Vídeňská č. 1083, pod označením IMG CZAS MEM-18.

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 směsí proteinů z moče pacientů s poškozenou ledvinou. Proteinová frakce obsahovala komponentu, která je přítomná na lidských monocytech.

Výhodou hybridomu je, že produkuje homogenní protilátku monoklonální, která je schopna specificky reagovat s lidskými monocyty. Hybridom MEM-18 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 konzerv, uchovávaných v kapalném dusíku, je možné zahájit produkci protilátky bez další potřeby antigenu. Protilátka, produkovaná hybridomem MEM-18 reaguje specificky s lidskými monocyty a není třeba se zbavovat protilátek balastních.

P ř í k l a d

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 intraperitoneálně/. Po 10 dnech růstu hybridomu v peritoneální dutině byla myš uhubena a naprodukováná ascitická tekutina odebrána.

Celkem bylo získáno 2,5 ml ascitické tekutiny, která obsahovala 3 mg/ml imunoglobulinu. Monoklonální protilátka reagovala specificky s monocyty periferní krve v nepřímém imuno-fluorescenčním a enzymoimunologickém testu. Lymfocyty, granulocyty a erythrocyty s protilátkou nereagovaly.

Specifita protilátky je identická s komerční monoklonální protilátkou MY-4, jak bylo prokázáno opakovanými paralelními stanoveními včetně použití směsí obou protilátek, a to jak v případě směsí periferních lymfocytů, tak u izolovaných monocytů z periferní krve /viz tab./. Reaguje s proteinovou frakcí moče některých pacientů s poškozenou ledvinou.

T a b u l k a

Reaktivita protilátek produkovaných hybridomem MEM-18 a MY-4¹ s buňkami periferní krve

Buňky periferní lidské krve ²	% pozitivních buněk reagujících s monoklonální protilátkou v nepřímém enzymoimunologickém ³ a imuno fluorescenčním testu ⁴		
	MEM-18	Směs MY-4	MEM-18 + MY-4
lymfocyty	1	1	1
monocyty	95	95	95
granulocyty	1	1	1
erythrocyty	1	1	1

1/ Komerční monoklonální protilátka od firmy Coulter Immunology, Hialeah, Floria, USA.

2/ Buňky lidské periferní krve byly izolovány popsanou metodou /Boyum, A.: Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. Scand. J. Immunol. 5, Suppl. 5:9, 1976/ na Verografin-Ficoll gradientu.

3/ Byl použit 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.

4/ Byla použita nepřímá imuno fluorescenční technika s využitím prasečího antimyšího imunoglobulinu značeného fluoresceuinisothiakyánátem /ÚSOL, Praha/.

5/ Monocyty lidské periferní krve byly izolovány popsanou metodou Recale, H. R.: A simple method of obtaining monocytes in suspension. J. Immunol. Meth., 69:71 až 77, 1984.

6/ Granulocyty lidské periferní krve byly izolovány na diskontinuálním hustotním Percoll gradientu /Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Švédsko/. Granulocyty byly získány na vrstvě Percollu o hustotě 1.09.

Identita antigenů rozeznávaných protilátkami MEM-18 a MY-4 byla prokázána izolací příslušného antigenu imunoafinitní chromatografií na imobilizované protilátce MEM-18 a demonstrací silné reaktivity tohoto antigenu s protilátkou MY-4.

Tento průkaz byl proveden následovně: Částečně vyčištěná protilátka MEM-18 byla navázána na CNBr-Sepharosu 4B /Pharmacia, Uppsala, Švédsko/ /5 mg/ml/. Směs proteinů z moče pacientů trpících proteinurií byla získána srážením síranem amonným do 75% nasycení, odsoledněním dialýsou proti vodě a lyofilizací.

Byly vybrány vzorky močí, které obsahovaly co nejvyšší koncentraci rozpustné formy antigenu reagujícího s protilátkou MEM-18 /testovaného i inhibičním enzymoimunologickým testem/. Takto získaná směs proteinů byla rozpuštěna v PBS /0,14 M roztok NaCl pufrováný 10 mM fosfátem pH 7,2/ a nanášena na kolonku Sepharosu 4B s kovalentně navázanou protilátkou MEM-18.

Po důkladném promytí byl specificky adsorbovaný antigen vymyt roztokem 2% dodecylsulfátu sodného /SDS/ a získaný vzorek analyzován elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS.

Po skončení elektroforézy byly separované proteiny elektroforeticky převedeny na nitrocelulózovou 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 detegovaný nepřímým enzymoimunologickým testem s využitím příslušné monoklonální protilátky a prasečí antitýšší protilátky konjugované s peroxidázou /ÚSOL, Praha/.

Jak protilátka MEM-18, tak MY-4 reagovaly silně s izolovaným antigenem /m. h. 55 000/. Stejný výsledek byl získán i v případě, že jako výchozí materiál pro izolaci antigenu byl použit lyzát monocytů roztokem obsahujícím 1 % detergent NP-40 /10⁷ buněk lyzováno 1 ml roztoku a nerozpustné zbytky odstraněny centrifugací/.

Identita antigenů rozeznávaných protilátkami MEM-18 a MY-4 byla prokázána také tak, že antigen reagující s protilátkou MEM-18 byl nejprve odstraněn s povrchu monocytů /"capping" následovaný internalizací/ a pak byla testována reaktivita takto pozměněných buněk s protilátkou MY-4.

Bylo zjištěno, že po odstranění antigenu MEM-18 vymizí také schopnost monocytů vázat protilátku MY-4, zatímco reaktivita s protilátkou B2M-01 /Hilgert, I., Hořejší, V., Křištofová, H.: The use of murine monoclonal antibody B2M-01 for detection and purification of human γ_2 -microglobulin. Folia biol. /Praha/ 30:369-376, 1984/ se nezmění.

Tento test byl prováděn tak, že roztok protilátky MEM-18 byl inkubován 30 min. při 20 °C s monocyty a poté 30 min. při 37 °C s protilátkou proti myšímú imunoglobulinu. S takto připravenými buňkami byl proveden běžný nepřímý imunofluorescenční test, tj. inkubace s protilátkami MEM-18, MY-4, B2M-01 a ve druhém kroku s prasečím antitýšším imunoglobulinem značeným fluoresceinisothiokyanatem.

Buňky hybridomu MEM-18 mají ultrastrukturní obraz typických myelomových buněk. Cytoplasma obsahuje velké množství polyribosomů, mitochondrie a slabě vyvinuté endoplasmatické retikulum. In vitro rostou jako polosuspensní kultury. Základním kultivačním médiem je Eaglovo minimální esenciální médium s Hanksovou solnou směsí doplněné o neesenciální aminokyseliny, L-glutamin /3 mM/, pyruvát sodný /1 mM/.

Toto médium /označované jako H-MEMd, Ústav molekulární genetiky CSAV/ je pro kultivaci hybridomu MEM-18 doplněno penicilinem, streptomycinem, gentamycinem, 2-merkaptóetanolem /0,05 mM/, pufrem HEPES /10 mM/ a inaktivovaným bovinním sérem /Bioveta, Ivanovice na Hané,

10%/. Hybridom je kultivován při 37 °C. Střední generační čas je 14,6 hod. a 6 měsíců po sestrojení byl modální počet chromosomů 95. Produkovaná protilátka je monoklonální imunoglobulin podtřídy IgG s lehkými řetězci typu kappa, její isoelektrický bod je pH 5,9 až 6,1.

Monoklonální protilátka produkovaná hybridomem MEM-18 reaguje specificky s lidskými monocyty. Hybridom MEM-18 může být průmyslově využíván jako zdroj monoklonální protilátky proti monocytům v analytických metodách.

Monoklonální protilátka hybridomu MEM-18 může být využita pro stanovení monocytů v periferní krvi při klinické diagnostice v zdravotnických zařízeních, zvláště při různých imunologických nedostatečnostech a autoimunních onemocněních a při detekci některých typů myeloidních leukemií.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS MEM-18 produkující monoklonální protilátku podtřídy IgG1 proti membránovému antigenu lidských monocytů.