

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

243879

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 15/00

(22) Přihlášeno 27 12 84
(21) PV 10 389-84

(40) Zveřejněno 17 09 85
(45) Vydáno 15 06 87

(75)

Autor vynálezu

NĚMEC MILOŠ RNDr. CSc.; ANGELISOVÁ PAVLA RNDr. CSc.;
HOŘEJŠÍ VÁCLAV RNDr. CSc., PRAHA

(54) Myší lymfocytární hybridom IMG-CZAS HL-38

Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS HL-38
produkující monoklonální protilátku podtřídy
Ig G2a proti membránovému antigenu lidských
HLA-DR pozitivních buněk.

Vynález se týká myšího lymfocytárního hybridomu, produkujícího protilátku proti membránovému antigenu lidských HLA-DR pozitivních buněk, uloženého ve sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV pod označením HL-38. Samotná monoklonální protilátka hybridomu HL-38 je vhodná pro použití v enzymoimunologické a imunofluorescenční analýze lidských HLA-DR pozitivních buněk.

Vynález se týká nového hybridomu, tj. hybridního jednobuněčného organismu, sestaveného fúzí buněk myší myelomové linie P3-X63-Ag8.653 a myší slezinné lymfoidní buňky, produkující protilátku proti membránovému antigenu HLA-DR přítomnému na lidských B buňkách, monocytech, makrofágách a aktivovaných T buňkách. Tyto antigeny mají zásadní význam pro regulaci různých funkcí imunitního systému. Kvantitativní stanovení HLA-DR pozitivních buněk má význam při diagnostice některých patologických stavů.

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 např. připravovány protilátky proti thymocytem, 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 v něm podaří vyhledat hybridom syntetizující protilátku, která rozeznává antigenní determinantu charakterizující určitý typ nebo třídu či podtřídu lymfocytů.

Podle publikovaného výsledku (Brodsky, F.M., Parham, P., Bodmer, W.F.: Monoclonal antibodies to HLA-DR determinants, *Tissue Antigens* 16: 30, 1980) se dá soudit, že lze připravit monoklonální protilátky rozpoznávající takové determinanty, které se nacházejí na HLA-DR antigenech všech jedinců v populaci (monomorfní determinanty). Takové monoklonální protilátky jsou výhodné pro diagnostické použití.

Podstatného pokroku v diagnostice lidských lymfocytů, projevujícího se vyšší spolehlivostí analytického výsledku, se dosáhne, je-li k dispozici hybridom, produkující monoklonální protilátku proti monomorfní determinantě lidských HLA-DR antigenů, uložený ve Sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV v Praze 4, Vídeňská č. 1083, pod označením IMG CZAS HL-38.

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 myší kmene BALB/c imunizovaných buňkami lidské B lymfoblastoidní linie Raji.

Výhodou hybridomu je, že produkuje homogenní protilátku monoklonální, která je schopna specificky reagovat s buňkami nesoucími HLA-DR antigeny. Hybridom HL-38 je možné kultivovat in vitro v médiích vhodných pro živočišné buňky a je adaptován pro růst in vivo v peritoneální dutině myší kmene BALB/c. Z konzerv, uchovávaných v kapalném dusíku, je možné zahájit produkci protilátky bez dalšího antigenu. Protilátka, produkovaná hybridomem HL-38, reaguje specificky s populacemi lidských buněk, v jejichž membráně jsou přítomny HLA-DR antigeny a není třeba se zbavovat protilátek balastních.

P ř í k l a d .

Za účelem pomnožení hybridomových buněk in vivo bylo aplikováno 6×10^6 buněk do peritoneální dutiny myši. Aby došlo k lepšímu uchycení aplikovaných buněk, byla myš 20 dnů před přenosem buněk hybridomu ovlivněna parafinovým olejem (0,5 ml intraperitoneálně). Po 14 dnech růstu hybridomu v peritoneální dutině byla myš usmrčena a naprodukováná ascitická tekutina odebrána. Celkem bylo získáno 4 ml ascitické tekutiny, která obsahovala 15 mg/ml imunoglobulinu. Monoklonální protilátka reagovala specificky v nepřímém imunofluorescenčním nebo enzymoimunologickém testu s částí lymfocytů periferní krve.

Oběma metodami bylo zjištěno 25 až 30 % pozitivních buněk v enzymoimunologickém testu až do ředění ascitické plazmy $1:10^5$ a v testu nepřímé imunofluorescence až do ředění $1:10^4$. Při použití čištěných populací T a B lymfocytů byla zjištěna reaktivita protilátky HL-38 s více než 95 % B lymfocytů a méně než 5 % T lymfocytů. Silně pozitivních bylo také více než 95 % monocytů, negativní byly granulocyty a erytrocyty. Specifita protilátky HL-38 je shodná s protilátkou RF-HLA-DR, jak bylo prokázáno opakovanými paralelními stanoveními včetně použití směsí protilátek, a to jak v případě směsi periferních lymfocytů, tak u izolovaných buněčných populací (viz tabulka).

Tabulka - Reaktivita protilátek produkovaných hybridomem HL-38 a RF-HLA-DR¹ s buňkami periferní krve

Buňky periferní lidské krve ²	% pozitivních buněk, reagujících s monoklonální protilátkou v enzymoimunologickém ³ nebo nepřímém imunofluorescenčním testu ⁴		
	HL-38	RF-HLA-DR	HL-38+RF-HLA-DR
lymfocyty	25 až 30	25 až 30	25 až 30
T lymfocyty ⁵	5 až 10	5 až 10	5 až 10
B lymfocyty ⁶	95	95	95
monocyty	95	95	95
granulocyty	1	1	1
erytrocyty	1	1	1

¹ Monoklonální protilátka RF-HLA-DR byla získána od Prof. G. Janossy z The Royal Free Hospital, Londýn.

² Buňky 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.

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 až 405, 1980.

⁴ Byla použita nepřímá imunofluorescenční technika s využitím prasečí protilátky proti myššímu imunoglobulinu značené fluoresceinisothiokyanatem (ÚSOL, Praha).

⁵ T lymfocyty byly izolovány průchodem směsí 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 až 649, 1971).

⁶ B lymfocyty byly izolovány adsorpcí 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 až 56, 1977).

Identita antigenů rozeznávaných protilátkami HL-38 a RF-HLA-DR byla prokázána izolací příslušného antigenu imunoafinitní chromatografií na imobilizované protilátce HL-38 a prokázáním silné reaktivity tohoto antigenu s protilátkou RF-HLA-DR. Antigen získaný imunoafinitní chromatografií na Sepharose 4B s kovalentně navázanou monoklonální protilátkou HL-38 poskytoval po elektroforéze v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného za neredukujících podmínek buď silnou zónu odpovídající m. h. 65 000 a slabé zóny o m. h. 29 000 a 33 000 (vzorek nebyl zahříván), nebo pouze 2 zóny odpovídající m. h. 29 000 a 33 000 (vzorek předem 2 min zahřát na 100 °C), což je výsledek typický pro HLA-DR antigeny (Shackelford, D. A., Kaufman, J. F., Korman, A. J., Strominger, J. L.: HLA-DR antigens: Structure, separation of subpopulation, gene cloning and function. Immunol. Rev. 66: 133 až 187, 1982).

Po elektroforetickém přenosu separovaných proteinů na nitrocelulosovou membránu a specifické detekci nepřímým enzymoimunologickým testem s využitím příslušné protilátky a prasečí protilátky proti myším imunoglobulinům konjugované s peroxidázou ŮSOL, Praha obě protilátky (HL-38 i RF-HLA-DR) reagovaly silně s antigenem v dimerní formě (m. h. 65 000) i s podjednotkou o m. h. 29 000 izolovaného antigenu.

Buňky hybridomu HL-38 mají ultrastrukturní obraz typických myelomových buněk. Cytoplazma obsahuje velké množství polyribosomů, mitochondrie a slabě vyvinuté endoplazmatické 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 (3 mM), pyruvát sodný (1 mM). Toto médium (označované jako H-MEMd, Ústav molekulární genetiky ČSAV) je pro kultivaci hybridomu HL-38 doplněno penicilinem, streptomycinem, gentamycinem, 2-merkaptotetanollem (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 16,2 hod. a 9 měsíců po sestrojení byl modální počet chromozomů 85. Produkovaná protilátka je monoklonální imunoglobulin podtřídy IgG2a s lehkými řetězci typu kapa, její izoelektrický bod je pH 5,9 až 6,5.

Monoklonální protilátka, produkovaná hybridodem HL-38, reaguje specificky s normálními lidskými B buňkami, monocyty, makrofágy a aktivovanými T buňkami. Hybridom HL-38 může být průmyslově využíván jako zdroj monoklonální protilátky proti HLA-DR pozitivním buňkám v analytických metodách. Monoklonální protilátka hybridomu HL-38 může být využita pro stanovení HLA-DR pozitivních buněk v periferní krvi a lymfatických orgánech při klinické diagnostice ve zdravotnických zařízeních, zvláště při různých imunologických nedostatečnostech a autoimunních onemocněních a pro klasifikaci leukémií a maligních lymfomů.

P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS HL-38 produkující monoklonální protilátku podtřídy Ig G2a proti membránovému antigenu lidských HLA-DR pozitivních buněk.