



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

255234

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 5/00

(22) Přihlášeno 30 09 86

(21) PV 7009-86.D

(40) Zveřejněno 11 06 87

(45) Vydáno 15 11 88

(75)
Autor vynálezu

HILGERT IVAN RNDr. CSc., PRAHA (ČSSR), STOJANOV STOJAN RNDr. CSc.,
VARNA (BLR), HOŘEJŠÍ VÁCLAV RNDr. CSc., KRIŠTOFOVÁ HANA RNDr.,
ANGELISOVÁ PAVLA RNDr. CSc., BAŽIL VLADIMÍR RNDr., PRAHA

(54) **Myší lymfocytární hybridom produkující protilátku proti společnému
antigenu lidských akutních lymfoblastických leukemií**

Řešení se týká myšího lymfocytárního hybridomu, produkujícího protilátku proti společnému antigenu lidských akutních lymfoblastických leukemií (CALL), uloženo ve sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV pod označením IMG CZAS NEM-78. Monoklonální protilátka hybridomu MEM-78 je vhodná pro použití v enzymoimunologické analýze nebo nepřímé imunofluorescenční analýze buněk s exprimovaným společným antigenem lidských akutních lymfoblastických leukemií.

Vynálezu se týká nového hybridomu, tj. hybridního jednobuněčného organismu, sestrojeného fúzí buňky myši myelomové linie Sp2/0-Ag14 a myši slezinné lymfoidní buňky, produkujícího protilátku proti společnému antigenu lidských akutních lymfoblastických leukemií (CALLA - common acute lymphoblastic leukemia antigen). Společný antigen lidské akutní lymfoblastické leukémie byl poprvé popsán Greaves M. S., Brown G., Rapson N. T., Glister, T. A. (Antisera to acute lymphoblastic leukemia cells. Clin. Immuno-path. 4:67, 1975) a je dnes považován za standardní imunologický znak platný pro diagnózu tohoto onemocnění.

Protilátky proti antigenům přítomným na určité populaci buněk se nedají připravit imunizací zvířat buněčnou suspenzí lymfocytů nebo membránovou frakcí, tj. konvenční imunizací. Konvenční imunizace 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. Příprava čistého antigenu bez kontaminace jinými membránovými komponentami k imunizaci je pracná a většinou neúspěšná.

Nevýhody konvenčních sér proti membránovým antigenům v principu odstraňuje použití hybridové technologie. Produkt hybridomu - monoklonální protilátka - je zaměřena vždy proti jediné antigenní determinatně. 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 lymfocytů nebo leukemických buněk.

Je řada antigenů (diferenciačních antigenů) na leukemických buňkách, které jsou asociovány s určitým stadiem diferenciace, při kterém je vývoj leukemické buňky zastaven. Tyto antigeny se liší molekulární hmotností, chemickou strukturou a fyziologickou funkcí. K detailní analýze antigenů na leukemických buňkách je nezbytně nutné mít protilátky proti co největšímu počtu diferenciačních antigenů. 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 protilátky specificky detegující různé antigeny na povrchu leukocytů nebo leukemických buněk.

Podstatného pokroku v diagnostice lidských leukemií, projevujícího se vyšší spolehlivostí analytického výsledku, se dosáhne, je-li k dispozici hybridom, produkující monoklonální protilátku proti společnému antigenu přítomnému na lidských buňkách akutních lymfoblastických leukemií, uložený ve Sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV v Praze 4, Vídeňská č. 1083, pod označením IMG CZAS MEM-78.

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 buňkami leukemické linie NALM-6. Na membráně těchto buněk je silně exprimován antigen společný pro buňky akutní lymfoblastické leukémie.

Výhodou hybridomu je, že produkuje homogenní protilátku monoklonální, která je schopna specificky reagovat s lidskými buňkami akutní lymfoblastické leukémie. Hybridom MEM-78 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 dalšího antigenu. Protilátka, produkovaná hybridomem MEM-78, reaguje se společným antigenem buněk akutní lymfoblastické leukémie a není třeba se zbavovat protilátek blastních.

P ř í k l a d

Za účelem pomnožení hybridových buněk in vivo bylo aplikováno 3×10^6 buněk do peritoneální dutiny myši. Aby došlo k lepšímu uchycení aplikovacích buněk, byla myš 10 dní před přenosem buněk hybridomu ovlivněna parafinovým olejem (0,5 ml intraperitoneálně). Po 22 dnech růstu hybridomu v peritoneální dutině byla myš uhubena a naprodukováná ascitická tekutina odebrána. Celkem bylo získáno 3 ml ascitické tekutiny, která obsahovala 10 mg/ml imunoglobulinu.

Monoklonální protilátka reagovala s kontinuálními lidskými leukemickými liniemi s exprimovaným společným antigenem lymfoblastické leukémie v nepřímém enzymoimunologickém a imunofluorescenčním testu. Lymfocyty, monocyty a erytrocyty s protilátkou nereagovaly, granulocyty reagovaly s protilátkou velmi slabě. Specificita protilátky je identická s monoklonální protilátkou ALB2 (Boucheix C., Perrot J. Y., Mirshahi M., Giannoni F., Billard M., Bernadou M., Rosenfeld C.: A new ser of monoclonal antibodies against acute lymfoblastic leukemia. Leukemia Research 9:597-604, 1985), jak bylo prokázáno opakovanými paralelními stanoveními na následujících kontinuálních lidských leukemických liniích:

Positivní: Reh, KM-3, NALM, Raji, Daudi

Negativní: MOLR-4, CEM, HL-60, U937

Protilátka MEM-78 a ALB2 reaguje také s některými buňkami kostní dřeně a nehemopoetickými buňkami (fetálními buňkami střeva a podocyty proximálních tubulů ledvin).

K průkazu, že protilátka MEM-78 rozpoznává společný antigen na povrchu buněk lidské lymfoblastické leukémie bylo použito tří přístupů:

a) Monoklonální protilátka MEM-78 precipitovala z metabolicky značených (methioninem ^{35}S) buněk (Brown J. L., Kato K., Silver J., Nathanson S. G.: Notable diversity in peptide composition of murine H-2K and H-2D alloantigens. Biochemistry 13:3174-3178, 1974) leukemické linie NALM-6 antigen o mol. hmotnosti 100 kDa (za redukcí i neredukujících podmínek), prokázanou pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného; mol. hmotnost této antigenní frakce odpovídá mol. hmotnosti společného antigenu lidských lymfoblastických leukemií - CALLA.

b) Identita antigenů rozeznávaných protilátkami MEM-78 a ALB2 byla také prokázána izolací příslušného antigenu imunoafinitní chromatografií na imobilizované protilátce MEM-78 a demonstrací silné reaktivity tohoto antigenu s protilátkou ALB2. Tento průkaz byl proveden následovně: Částečně vyčištěná protilátka MEM-78 byla navázána na CNBr-Sepharosu 4B (Pharmacia, Uppsala, Švédsko) (5 mg/ml). Buňky leukemické linie NALM-6 byly solubilizovány v roztoku obsahujícím detergent NP-40 (1 %) a získaný extrakt byl nanesen na kolonku Sepharosu 4B s kovalentně navázanou protilátkou MEM-78. Po důkladném promytí byl specificky adsorbovaný antigenem 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 nitrocelulóзовou membránu (Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:4350-4354, 1979) a detegovány nepřímým enzymoimunologickým testem s využitím příslušné monoklonální protilátky a prasečí antimyší protilátky konjugované s peroxidázou (ÚSOL, Praha). Jak protilátka MEM-78, tak ALB2 reagovaly silně s izolovaným antigenem.

c) Identita antigenů rozpoznávaných protilátkami MEM-78 a ALB2 byla prokázána tak, že antigen reagující s protilátkou MEM-78 byl nejprve přemístěn k jednomu pólu leukemických buněk NALM-6, tzv. vytvoření čepiček ("capping") s následným pohlcením antigenu do nitra většiny buněk a pak byla testována reaktivita takto pozměněných buněk s protilátkou ALB2. Bylo zjištěno, že po odstranění společného antigenu akutních lymfoblastických leukemií

(protilátkou MEM-78) vymizí také schopnost NALM-6 buněk vázat protilátku ALB2, zatímco reaktivita s protilátkou nepříbuzné specifčnosti B2M-01 (Hilgert, I., Hořejší, V., Křištofová, H.: The use of murine monoclonal antibody B2M-01 for detection and purification of human β_2 -microglobulin. *Fol. biol. (Praha)* 30:369-376, 1984) se nezmění. Tento test byl prováděn tak, že NALM-6 buňky byly indukovány 30 min při 20 °C v roztoku protilátky NEM-78 a poté 30 min při 37 °C s prasečí protilátkou proti myšímu imunoglobulinu. S takto připravenými buňkami byl proveden běžný nepřímý imunofluorescenční test, tj. inkubace s protilátkami NEM-78, ALB2, B2M-01 a ve druhém kroku s prasečím antimyším imunoglobinem značeným fluoresceinisothiokyanátem. NALM-6 buňky byly před inkubací s následující protilátkou promyty vždy fyziologickým roztokem.

Buňky hybridu MEM-78 mají ultrastrukturní obraz typických myelomových buněk. 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 (1 mM). Toto médium (označované jako RPMI, Ústav molekulární genetiky ČSAV) je pro kultivaci hybridu MEM-78 doplněno penicilinem, streptomycinem, gentamycinem, 2-merkaptoetanolem (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 20 hod. a 5 měsíců po sestrojení byl modální počet chromosomů 92. Produkovaná protilátka je monoklonální imunoglobulin podtřídy IgG1 s lehkými řetězci typu kapa, její isoelektrický bod je pH 6,7 až 6,9.

Monoklonální protilátka produkovaná hybridomem MEM-78 reaguje se společným antigenem lymfoblastické leukémie. Hybridom MEM-78 může být průmyslově využíván jako zdroj monoklonální protilátky proti buňkám lidské lymfoblastické leukémie v analytických metodách. Monoklonální protilátka hybridu MEM-78 může být využita pro klasifikaci akutních lymfoblastických leukémií při klinické diagnostice ve zdravotnických zařízeních. Monoklonální protilátka MEM-78 může být využita také v transplantační terapii k odstranění leukemických buněk persistujících v autologních buňkách kostní dřeně u pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií.

P R Ě D M Ě T V Y N Á L E Z U

Myší lymfocytární hybridom IMG MEM-78 produkuje monoklonální protilátku podtřídy IgG1 proti společnému antigenu lidských buněk akutních lymfoblastických leukémií.