



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

228859
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 5/00

(22) Přihlášeno 10 08 82
(21) (PV 5932-82)

(40) Zveřejněno 15 09 83

(45) Vydáno 15 08 86

(75)
Autor vynálezu

NĚMEC MILOŠ RNDr. CSc., VIKLICKÝ VLADIMÍR MUDr. CSc., BÁRTEK
JIRÍ MUDr., PRAHA, SLEPIČKA LADISLAV, VANÁK JAN MUDr.,
OLOMOUC

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

1

Vynález se týká nového hybridomu, tj. hybridního jednobuněčného organismu, sestaveného fúzí buňky myší myelomové linie P3-X63-Ag8.653 a myší slezinové lymfocytární 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 například 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, případně substancí A přípra-

2

venou z lidských slin nebo zvířecího materiálu — například 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, jimiž 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 nejružnějším 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 nutné 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 A₁ a A₂, případně A₁B a A₂B 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 hybridy.

Zdrojem monoklonální protilátky proti lidskému erytrocytárnímu skupinovému antigenu A je hybridom, uložený ve sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV v Praze 4, Vídeňská ul. č. 1083, pod označením IMG CZAS HE-02.

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. 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, 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-02 produkuje zcela homogenní protilátku, tzv. protilátku monoklonální, která specificky reaguje s lidskými typovými erytrocyty A₁, A₁B a A₂ a nereaguje s erytrocyty A₂B, B a O. Hybridom HE-02 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-02 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-02 je specifická pro lidský erytrocytární skupinový antigen A a je prostá jakýchkoliv balastních protilátek.

Příklad

Za účelem pomnožení buněk hybridomu HE-02 v podmínkách in vivo bylo aplikováno 3×10^6 hybridomových buněk do peritoneální dutiny myší Balb/c. Pro zlepšení uchycení aplikovaných buněk a podporu rozvoje hybridomu v peritoneální dutině myší byla zvířata 14 dnů před podáním hybridomových buněk ovlivněna 0,5 ml parafinového oleje injikovaného intraperitoneálně. Po 17 dnech růstu hybridomu v peritoneální dutině byla vybraná myš usmrcena a vytvořená ascitická tekutina odebrána. Celkem bylo získána 4,7 ml ascitické tekutiny obsahující 14 mg/ml imunoglobulinu. Účinnost monoklonální protilátky HE-02 byla testována postupným dvojnásobným ředěním ascitické tekutiny v prostředí izotonického roztoku chloridu sodného v aglutinačních zkumavkách podle oborové normy ON číslo 84 3225. Ascitická tekutina aglutinovala na + (podle ON 84 3225) erytrocyty A₁ v ředění 1:10⁵, erytrocyty A₁B v ředění 1:5 $\times$ 10⁴, erytrocyty A₂ v ředění 1:1024. S erytrocyty A₂B, B a O ascitická tekutina nereagovala.

Buňky hybridomu HE-02 mají ultrastrukturální obraz typických myelomových buněk, kde převažující organelou jsou volné a na membrány vázané polyribosomy. V podmínkách in vitro rostou v podobě polosuspenních kultur. Základní kultivačním médiem je Eaglovo minimální esenciální médium s Hanksovou solnou směsí, doplněné o neesenciální aminokyseliny, L-glutamin (3 mM) a pyruvát sodný (1 mM). Toto médium (označované jako H-MEMd, Ústav molekulární genetiky ČSAV) je pro kultivaci hybridomu HE-02 doplněno penicilinem, streptomycinem, gentamycinem, 2-merkaptethanolem (5×10^{-5} M), puforem HEPES ($2 - 4 \times 10^{-3}$ M) a inaktivovaným bovinním sérem pro TK (Bioveta, n. p., Ivanovice na Hané, 10%).

Hybridom HE-02 je kultivován při 37 °C. Střední generační čas je 16,6 hod., modální počet chromosomů 13 měsíců po sestrojení (fúzi) je 84 chromosomů. Produkovaná monoklonální protilátka je imunoglobulin třídy IgM.

Monoklonální protilátka produkovaná lymfocytárním myším hybridomem HE-02 může být využita ve zdravotnické praxi k bezpečnému odlišení lidského erytrocytárního antigenu podskupiny A₁B od antigenu podskupiny A₂B.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Myší lymfocythární hybridom IMG CZAS HE-02, produkující monoklonální protilátku

třídy IgM proti lidskému erytrocytárnímu skupinovému antigenu A.