



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

244 399

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita  
(22) Přihlášen: 20. 02. 85  
(21) PV 1215-85

(51) Int. Cl. 4  
C 12 N 15/00

(40) Zveřejněno 31. 08. 85  
(45) Vydáno 01. 06. 88

(75)  
Autor vynálezu

RYCHLÍKOVÁ MILENA RNDr. CSc.; HINZOVÁ EVA RNDr.;  
NOSEK JINDŘICH RNDr.; ČUKROVÁ VĚRA RNDr. CSc.;  
FOREJT JIŘÍ MUDr. CSc., PRAHA

(54) Myší lymfocytární hybridom IMG-CSAZ HLA-01

Řešení se týká myšího hybridomu, produkujícího protilátku proti membránovému antigenu lidských HLA-Bw4 pozitivních buněk, uloženého ve sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV pod označením HLA-01. Monoklonální protilátka hybridomu HLA-01 je vhodná pro použití v mikrocytotoxičném testu v přítomnosti komplementu a v přímém radioimunoanalytickém vazebném testu pro detekci lidských HLA-Bw4 pozitivních buněk.

Vynález se týká nového hybridomu, tj. hybridního jednobuněčného organismu, sestaveného fúzí buňky myši myelomové linie P3-X63-Ag8.653 a myši slezinné buňky produkující protilátku proti membránovému antigenu HLA-Bw4 přítomnému na lidských lymfocytech. HLA antigeny mají zásadní význam pro regulaci různých funkcí imunitního systému. Identifikace těchto antigenů má význam při transplantaci životně důležitých tkání a orgánů a při diagnostice některých patologických stavů.

Doposud se protilátky proti antigenům hlavního histokompatibilitního systému člověka, HLA, získávají ze sér žen po opakovaných těhotenstvích nebo od pacientů po opakovaných transfuzích krve. Ačkoliv tato séra mají zásadní význam při definici HLA antigenů, jejich omezení spočívá v tom, že antiséra obsahují protilátky v nízkém titru, jsou multispecifická a křížově reagují. Velice těžko se vyhledávají antiséra, která by obsahovala protilátky, které by identifikovaly některé vzácně se vyskytující HLA specifčnosti. Z tohoto důvodu se hledaly přístupy, které by umožnily snadněji identifikovat HLA antigeny. Jeden z přístupů je imunizace dobrovolníků nebo pokusných zvířat. Sérum takto imunizovaných lidí nebo zvířat odebírané po určité době působení antigenu slouží jako zdroj protilátek užívaných pro identifikaci HLA antigenů. Tento postup nazývaný konvenční imunizací má řadu nevýhod. Získávání protilátek ze sér imunizovaných dobrovolníků z etického hlediska nemá praktického použití. V séru imunizovaných zvířat se nachází heterogenní směs protilátek, jejichž spektrum je v každém organismu různé a neopakovatelné. Organismus vytváří protilátky proti celé řadě membránových antigenů a specificita sér závisí na způsobu jejich absorpce a testování. Antiséra připravená konvenčním způsobem je proto velmi těžké standardizovat.

Nevýhody konvenčních sér proti antigenům hlavního histokompatibilitního systému člověka HLA 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 hlavního histokompatibilitního systému člověka HLA.

Podle publikovaného výsledku (Brodsky, F.M., Parham, P., Barnstable, C.J., Crumpton, M.J., Bodmer, W.F.: Monoclonal antibodies for analysis of HLA system. *Immunol. Rev.*, 47: 326, 1979; Radka, S.F., Kostyu, D.D., Amos, D.B.: A monoclonal antibody directed against the HLA-Bw6 epitope. *J. Immunol.*, 128:2804, 1982) se dá soudit, že lze připravit monoklonální protilátky specificky detegující polymorfní determinanty HLA komplexu výhodné pro diagnostické účely.

Podstatného pokroku při výběru vhodného dárce při klinických transplantacích orgánů, při posuzování paternitních sporů, při diagnostice některých onemocnění, u kterých bylo prokázáno, že jejich výskyt je asociován s výskytem některých HLA antigenů, se dosáhne, je-li k dispozici hybridom, produkující monoklonální protilátku proti polymorfní determinantě HLA komplexu. Bw4 hybridom je uložený ve sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV v Praze 4, Vídeňská 1083, pod označením HLA-01.

Uvedený hybridom byl získán způsobem známým z odborné literatury (Richiardi, P., Amoroso, A., Crepaldi, T., Ceppellini, R., Trucco, M.: A xenogeneic monoclonal antibody recognizing specificities controlled by HLA-A and B alleles. *Immunogenetics*, 12:615-626, 1981; Russo, C., Ah-Kau Ng, Pellegrino, M.A., Ferrone, S.: The monoclonal antibody CR11-351 discriminates HLA-A2 variants identified by T cells. *Immunogenetics*, 18:23-35, 1983) klonováním souboru hybridních buněk, získaných ze slezin myši kmene BALB/c imunizovaných lymfocyty izolovanými z periferní krve dárce PS HLA genotypu (HLA-A3,28, HLA-B14, 16/39, Bw4, Bw6, Dw2, DR2, DR6).

Výhodou hybridomu je, že produkuje homogenní protilátku monoklonální, která je schopná specificky reagovat s buňkami nesoucími antigen HLA-Bw4 kodovaný HLA-B lokusem. Hybridom HLA-01 je možno 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 možno zahájit produkci protilátky bez dalšího antigenu. Protilátka pro-

dukovaná hybridomem HLA-01 reaguje specificky s populacemi lidských lymfocytů exprimujících antigen Bw4 a není třeba se zbavovat balastních protilátek.

#### Příklad

Za účelem pomnožení hybridomových buněk in vivo bylo aplikováno  $4 \times 10^6$  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 13ti dnech růstu hybridomu v peritoneální dutině byla myš uhubena a naprodukováná ascitická tekutina odebrána. Celkem bylo získáno 2,5 ml ascitické tekutiny, která obsahovala 6 mg/ml imunoglobulinu. Monoklonální protilátka reagovala specificky v mikrocytotoxickém testu v přítomnosti komplementu a v přímém radioimunoanalytickém vazebném testu s lymfocyty periferní krve exprimujícími na svém povrchu Bw4 antigen. V mikrocytotoxickém testu byla ascitická tekutina aktivní s buňkami imunizujícího jedince PS ještě v ředění  $1:10^6$ . Výsledky mikrocytotoxického i přímého radioimunoanalytického testu ukázaly, že monoklonální protilátka HLA-01 deteguje Bw4 antigen kodovaný HLA-B lokusem. Tento výsledek byl získán jednak na základě vyšetření lymfocytů periferní krve od 60 jedinců otypizovaných na HLA antigeny konvenčními séry a jednak na základě vyšetření 4 mnohočetných rodin (8 rodičů a 32 dětí). Při testování lymfocytů 60 nepříbuzných jedinců náhodně vybraných reagovala protilátka s lymfocyty pouze těch lidí, jejichž lymfocyty exprimovaly antigen Bw4. V rodinných studiích provedených na 8 rodičích a 32 dětech bylo prokázáno, že gen pro antigen, který tato protilátka deteguje, segreguje s hlavním histokompatibilitním systémem člověka HLA a deteguje antigen Bw4. Naproti tomu negativní výsledky s monoklonální protilátkou HLA-01 v obou použitých testech byly získány s buňkami Daudi, což je permanentní lymfoidní linie, která neexprimuje HLA-A, -B, -C antigeny a též s lymfocyty 14 inbredních kmenů myši.

Buňky hybridomu HLA-01 mají ultrastrukturní obraz typických myelomových buněk. Cytoplasma obsahuje velké množství polyribosomů, mitochondrie a slabě vyvinuté endoplasmatické 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 (3mM) a pyruvát sodný (1mM). Toto médium (označované jako H-MEMd, Ústav molekulární genetiky ČSAV) je pro kultivaci hybridomu MEM-12 doplněno penicilinem, streptomycinem, gentamycinem, 2-merkaptoetanolem (0,05mM), pufrům HEPES (10mM) a inaktivovaným bovinním sérem (Bioveta, Ivanovice na Hané, 10%). Hybridom je kultivován při 37°C. Střední generační čas je 15,6 hod. a 5 měsíců po sestrojení byl modální počet chromozomů 96. Produkovaná protilátka je monoklonální imunoglobulin podtřídy IgG2b s lehkými řetězci typu kappa, její izoelektrický bod je pH 6,9 až 7,0.

Monoklonální protilátka produkovaná hybridomem HLA-01 reaguje specificky s lidskými lymfocyty izolovanými z periferní krve. Hybridom HLA-01 může být průmyslově využíván jako zdroj monoklonální protilátky, která deteguje buňky nesoucí Bw4 antigen v diagnostických metodách. Monoklonální protilátka hybridomu HLA-01 může být využita v klinických imunologických laboratořích k výběru vhodného dárce při klinických transplantacích životně důležitých orgánů a tkání, při diagnostice onemocnění, u nichž byla prokázána signifikantní asociace s výskytem HLA-Bw4 antigenu a v soudním lékařství při paternitních sporech.

#### P R Ě D M Ě T V Y N Á L E Z U

Myší lymfocytární hybridom IMG-CZAS HLA-01, produkující monoklonální protilátka podtřídy IgG2b proti membránovému antigenu lidských HLA-Bw4 pozitivních buněk.