



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

252450

(11) B₁

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 5/00

(61)

(23) Výstavní prioritizace
(22) Přihlášeno 24 03 86
(21) PV 2067-86

(40) Zveřejněno 15 01 87
(45) Vydáno 25.06.88

(75)
Autor vynálezu

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

(54)

Myší lymfocytární hybridom IMG SZAS HL-40

Řešení se týká myšího lymfocytárního hybridomu, produkujícího protilátku proti membránovým HLA antigenům II. třídy /HLA-DR, HLA-DP/ lidských buněk, uložené-
ho ve sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV pod označením IMG CZAS HL-40. Monoklonální protilátka hybridomu HL-40 je vhodná pro použití v enzymoimuno-
logické a imunofluorescenční analýze lidských buněk s membránovými HLA antigeny II. třídy; její předností je velmi výrazné značení terčových buněk v suspenzích i na tkánových řezech.

Vynález se týká nového hybridomu, tj. hybridního jednobuněčného organismu, sestaveného fúzí buňky myši myelomové linie P3-X63-Ag8.653 a myši slezinové lymfoidní buňky produkující protilátku proti monomorfni determinantě membránových HLA antigenů II. třídy, /HLA-DR, HLA-DP/ přítomných na lidských B buňkách, monocytech, makrofázích a aktivovaných T buňkách. Tyto antigeny mají zásadní význam pro regulaci různých funkcí imunitního systému. Kvantitativní stanovení buněk s membránovými HLA antigeny II. třídy má význam při diagnostice některých patologických stavů a klasifikaci lidských hematologických nádorových onemocnění.

Doposud se protilátky proti membránovým antigenům lidských buněk 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 lidským thymocytům, které jsou používány k útlumu alotransplantačních reakcí při transplantaci orgánů v klinické medicíně. Tento postup, nazývaný konvenční imunizací, má neodstranitelnou nevýhodu v tom, že séra obsahují heterogenní směs protilátek proti mnoha různým 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 zaměřen 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 antigenech II. třídy všech jedinců v populaci /monomorfní determinanty/. Takové monoklonální protilátky jsou výhodné pro diagnostické použití.

Podstatného pokroku v diagnostice lidských leukocytů a z nich odvozených chorob, projevujícího se vyšší spolehlivostí analytického výsledku, se dosáhne, je-li k dispozici hybridom, produkující monoklonální protilátku proti monomorfní determinantě lidských HLA antigenů II. třídy, uložený ve Sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV v Praze 4, Vídeňská č. 1083, pod označením IMG CZAS HL-40.

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 lidské B lymfoblastoidní linie Raji.

Výhodou hybridomu je, že produkuje homogenní protilátku monoklonální, která je schopna specificky reagovat s buňkami nesoucími HLA antigeny II. třídy. Hybridom HL-40 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 HL-40, reaguje specificky s populacemi lidských buněk, v jejichž membráně jsou přítomny HLA antigeny II. třídy /HLA-DR, HLA-DP/ a není třeba se zbavovat protilátek balastních.

Příklad

Za účelem pomnožení hybridomových buněk in vivo bylo aplikováno 3×10^6 buněk do peritoneální dutiny myši. Aby došlo k lepšímu uchycení aplikovaných buněk, byla myš 14 dnů před přenosem buněk hybridomu ovlivněna parafinovým olejem /0,5 ml intraperitoneálně/. Po 11 dnech růstu hybridomu v peritoneální dutině byla myš usmrcena a naprodukováná ascitická tekutina odebrána. Celkem bylo získáno 5,5 ml ascitické tekutiny, která obsahovala 16 mg/ml imunoglobulinu. Monoklonální protilátka reagovala specificky v nepřímém imunofluorescenčním nebo enzymoimunologickém testu s částí lymfocytů periferní krve. Oběma metodami bylo zjištěno 25-30% pozitivních buněk v enzymoimunologickém testu až do ředění ascitické plasmy $1:10^5$ a v testu nepřímé imunofluorescence až do ředění $1:10^4$. Při použití čištěných populací T a B lymfocytů byla zjištěna reaktivita protilátky HL-40 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. Specifičností protilátka HL-40 odpovídá standardní zahraniční monoklonální protilátce RF-HLA-DR, jak bylo prokázáno opakovanými paralelními stanoveními, včetně použití směsí protilátek, a to jak v případě směsí periferních lymfocytů, tak u izolovaných buněčných populací /viz tabulka/ a stabilizovaných lidských lymfoidních a nelymfoidních linií.

Tab. Reaktivita protilátek produkovaných hybridomem HL-40 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-40	RF-HLA-DR	HL-40+RF-HLA-DR
lymfocyty	25±30	25±30	25±30
T lymfocyty ⁵	5±10	5±10	5±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. Janossyho 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: 393-405, 1980.
- ⁴ Byla použita nepřímá imunofluorescenční technika s využitím prasečí protilátky proti myšímu imunoglobulinu značená fluoresceinisothiokyanátem /OSOL, Praha/.
- ⁵ Tlymfocyty byly izolovány průchodem směsi 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. 3:645-649, 1973/.
- ⁶ B lymfocyty byly izolovány adsorbci 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: 47-56, 1977/.

Identita antigenů rozeznávaných protilátkami HL-40 a RF-HLA-DR byla prokázána izolací příslušného antigenu imunoafinitní chromatografií na imobilizované protilátce HL-40 a prokázáním silné reaktivity tohoto antigenu s protilátkou RF-HLA-DR. Antigen získaný imunoafinitní chromatografií na Sepharose 4B s kovalentně navázanou monoklonální protilátkou HL-40 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 antigeny II. třídy /Shackelford, D.A., Kaufman, J.E.- Korman, A.J., Strominger, J.L.: HLA-DR antigens: Structure, separation of subpopulation, gene cloning and function. Immunol. Rev. 66: 133-187, 1982/. Po elektroforetickém přenosu separovaných proteinů na nitrocelulózovou membránu a specifické detekci nepřímým enzymoimunologickým testem /s využitím příslušné protilátky a prasečí protilátky proti myším imunoglobulinům konjugované s peroxidázou/ /ÚSOL, Praha/ obě protilátky /HL-40 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-40 mají ultrastrukturní obraz typických myelomových buněk. Cytoplasma obsahuje velké množství polyribosomů, mitochondrie a slabě vyvinuté endoplasmatické retikulum. In vitro rostou jako podosuspenzní 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-40 doplněno penicilinem, streptomycinem, gentamycinem, 2-merkaptoetanollem /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 17,1 hod. a 18 měsíců po sestrojení byl modální počet chromosomů 78. Produkovaná protilátka je monoklonální imunoglobulin podtřídy IgG2a s lehkými řetězci typu kappa, její isoelektrický bod je pH 7,8 až 8,4.

Monoklonální protilátka produkovaná hybridomem HL-40 reaguje specificky s normálními lidskými B buňkami, monocyty, makrofágy a aktivovanými T buňkami. Hybridom HL-40 může být

průmyslově využíván jako zdroj monoklonální protilátky proti buňkám s membránovými HLA antigeny II. třídy v analytických metodách. Monoklonální protilátka hybridomu HL-40 může být využita pro stanovení těchto 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. Předností monoklonální protilátky HL-40 je velmi výrazné značení tkáňových buněk nesoucích HLA antigeny II. třídy /HLA-DR, HLA-DP/ v imunofluorescenčních i enzymoimunologických testech buněčných suspenzí i tkáňových řezů.

P R Ě D M Ě T V Y N Ā L E Z U

Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS HL-40 produkuje monoklonální protilátku podtřídy IgG2a proti membránovým HLA antigenům II. třídy lidských buněk.