ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA
(19)

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

244 200

(11) (B1)

(61)
(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 06 11 84
(21) PV 8437-84

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

(40) Zveřejněno 17 09 85
(45) Vydáno 01 06 88

(75)
Autor vynálezu HILGERT IVAN RNDr. CSc.;
HOŘEJŠÍ VÁCLAV RNDr. CSc.;
KRIŠTOFOVA HANA RNDr., PRAHA

(54) Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS MEM-12

Řešení 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 MEM-12. Samotná monoklonální protilátka hybridomu MEM-12 je vhodná pro použití v enzymoimunologické a imunofluorescenční analýze lidských HLA-DR pozitivních buněk.

244 200

Vynález se týká nového hybridomu, tj. hybridního jednobuněčného organismu, sestrojeného fúzí buňky myší myelomové linie Sp2/0-Ag14 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 positivních 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 například připravovány protilátky proti thymocytům, 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 z něho 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-DRw determinants, Tissue Antigens 16:30, 1980) se dá soudit, že lze připravit

monoklonální protilátky specificky detegující monomorfní determinanty na HLA-DR antigenech, výhodné pro diagnostické použití. Monomorfními rozumíme takové determinanty, které jsou přítomny ve všech formách HLA-DR antigenu v lidské populaci.

Podstatného pokroku v diagnostice lidských lymfocytů, projevujícího se vyšší spolehlivostí analytického výsledku, se dosáhne, je-li k disposici 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 MEM-12.

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 membránovou frakcí buněk lidských thymů.

Výhodou hybridomu je, že produkuje homogenní protilátku monoklonální, která je schopna specificky reagovat s buňkami nesoucími DR antigeny. Hybridom MEM-12 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 konserv, uchovávaných v kapalném dusíku, je možné zahájit produkci protilátky bez dalšího antigenu. Protilátka, produkovaná hybridomem MEM-12, reaguje specificky s populacemi lidských buněk exprimujících DR antigeny a není třeba se zbavovat protilátek balastních.

Příklad

Za účelem pomnožení hybridomových buněk in vivo bylo apli-

kováno 4 x 10^6 buněk do peritoneální dutiny myší. Aby došlo k lepšímu uchycení aplikovaných buněk, byla myš 14 dní před přenosem buněk hybridomu ovlivněna parafinovým olejem (0,5 ml intraperitoneálně). Po 11 dnech růstu hybridomu v peritoneální dutině byla myš uhubena a naprodukovaná ascitická tekutina odebrána. Celkem bylo získáno 2,5ml ascitické tekutiny, která obsahovala 5 mg/ml imunoglobulinu. Monoklonální protilátka reagovala specificky v nepřímém imunofluorescenčním nebo enzymoimunologickém testu s částí lymfocytů periferní krve. Oběma metodami bylo zjištěno 25až 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 populaci T a B lymfocytů byla zjištěna reaktivita protilátky MEM-12 s více než 95% B lymfocytů a 5-10% T lymfocytů. Silně pozitivních bylo také více než 95% monocytů, negativní byly granulocyty a erytrocyty. Specifita protilátky MEM-12 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).

Tab. Reaktivita protilátek produkovaných hybridomem MEM-12 a RF-HLA-DR[1] s buňkami periferní krve

Buňky periferní lidské krve[2]	% positivních buněk reagujících s monoklonální protilátkou v enzymoimunologickém[3] nebo nepřímém imunofluorescenčním testu[4]		
	MEM-12	RF-HLA-DR	MEM-12+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. Janossy z The Royal Free Hospital, Londýn.

[2]Buňky lidské periferní krve byly izolovány popsanou metodou (Böyum, 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 prasečího antimyšího imunoglobulinu značeného fluoresceinisothiokyanatem (ÚSOL, Praha).

[5]T lymfocyty 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. Eur.J.Immunol. 3:645-649, 1971).

[6]B lymfocyty byly izolovány adsorbcí na plastikové 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 MEM-12 a RF-HLA-DR byla prokázána izolací příslušného antigenu imunoafinitní chromatografií na imobilizované protilátce MEM-12 a demonstrací reaktivity tohoto antigenu s protilátkou RF-HLA-DR. Antigen získaný imunoafinitní chromatografií na Sepharose 4B s kovalentně navázanou protilátkou MEM-12 poskytoval po elektroforéze v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného buď 1 zónu odpovídající m.h. 60 až 65 000

(vzorek nezahříván), nebo 2 zóny odpovídající m.h. 29 000 a 33 000 (vzorek předem 2 min. zahřát na 100°C), což je výsledek typický pro DR antigeny (Shackleford, D.A., Kaufman, J.F., Korman, A.J., Strominger, J.L.: HLA-DR antigens: Structure, separation of subpopulation, gene cloning and function. Immunol.Rev. 66:133-187, 1982). Po elektroforetickém přenosu separovaných proteinů na nitrocelulózovou membránu a specifické detekci nepřímým enzymoimunologickým testem (s využitím příslušné monoklonální protilátky a prasečího antimyšího imunoglobulinu konjugovaného s peroxidázou (ÚSOL, Praha)). Obě protilátky (MEM-12 a RF-HLA-DR) reagovaly silně s antigenem v dimerní formě (m.h. 60 až 65 000), protilátka RF-HLA-DR reagovala s podjednotkou o m.h. 29 000 izolovaného antigenu.

Buňky hybridomu MEM-12 mají ultrastrukturní obraz typických myelomových buněk. Cytoplazma obsahuje velké množství polyribosomů, mitochondrie a slabě vyvinuté endoplazmatické retikulum. In vitro rostou jako polosuspenzní kultury. Základním kultivačním médiem je Eaglovo minimální esenciální médium s Hanksovou solnou směsí doplněné o neesenciální aminokyseliny, L-glutamin (3mM), 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 (0,05 mM), pufrem HEPES (10 mM) a inaktivovaným bovinním sérem (Bioveta, Ivanovice na Hané, 10%). Hybridom je kultivován při 37°C. Střední generační čas je 16.8 hod. a 5 měsíců po sestrojení byl modální počet chromozomů 96. Produkovaná protilátka je monoklonální imunoglobulin podtřídy IgG1 s lehkými řetězci typu kapa, její izoelektrický bod je pH 6.8 - 7.0.

Monoklonální protilátka produkovaná hybridomem MEM-12 reaguje specificky s lidskými B buňkami, monocyty, makrofágy a aktivovanými T buňkami. Hybridom MEM-12 může být průmyslově využíván jako zdroj monoklonální protilátky proti DR pozitiv-

ním buňkám v analytických metodách. Monoklonální protilátka hybridomu MEM-12 může být využita pro stanovení DR pozitivních buněk v periferní krvi a lymfatických orgánech při klinické diagnostice v zdravotnických zařízeních, zvláště při různých imunologických nedostatečnostech a autoimunních onemocněních a pro klasifikaci leukémií a maligních lymfomů.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS MEM-12 produkující monoklonální protilátku podtřídy IgG1 proti membránovému antigenu lidských HLA-DR pozitivních buněk.

Vytiskly Moravské tiskařské závody,
střed. 11 100, tř.Lidových milicí 3, Olomouc Cena: 2,40 Kčs