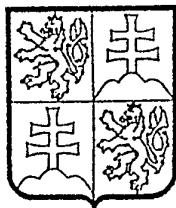


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS 275 909

(21) Číslo přihlášky : 6478-89.C

(22) Přihlášeno : 16 11 89

(30) Prioritní data :

(13) Druh dokumentu : B6

(51) Int. Cl.⁵ :

C 12 N 5/00

(40) Zveřejněno : 11 06 91

(47) Uděleno : 20 12 91

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 18 03 92

(73) Majitel patentu : ÚSTAV SÉR A OČKOVACÍCH LÁTEK, s.p., PRAHA

(72) Původce vynálezu : NĚMEC MILOŠ RNDr. CSc., PRAHA,
VAŇÁK JAN MUDr. CSc.,
DRÍMALOVÁ DAGMAR MUDr. CSc., OLOMOUČ,
VIKlický VLADIMÍR MUDr. CSc., PRAHA

(54) Název vynálezu : Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS HE-193
produkující protilátku proti lidskému
skupinovému antigenu A

(57) Anotace :

Myší lymfocytární hybridom produkuje protilátku proti antigenu lidské krevní skupiny A, a je uložený ve sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV v Praze pod označením IMG CZAS HE-193. Samotná monoklonální protilátka hybridomu HE-193 je vhodná pro použití ve zdravotnické praxi, jako diagnostikum skupinového antigenu A při vyšetřování skupinové příslušnosti lidských erytrocytů v systému ABO.

Vynález se týká nového hybridomu, tj. hybridního jednobuněčného organismu, sestaveného fúzí buňky myší myelomové linie Sp2/O-Ag 14 a myší slezinné lymfoidní buňky, produkující protilátku proti lidskému antigenu krevní skupiny A.

Diagnostická séra proti lidskému antigenu krevní skupiny A (zkráceně diagnostická séra anti-A) jsou základní složkou diagnostických souborů 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, popřípadě substancí A připravenou z lidských slin nebo zvířecího materiálu - například žaludeční mukózy prasat nebo koní. Substance užívané k imunizaci lidských dobrovolníků je nezbytné podrobit státní kontrole sterility, antigenní účinnosti a neškodnosti. Protože koncentrace žádaných protilátek v séru klesá po imunizaci s časem, je nutné provádět imunizace opakovaně. Imunizace dobrovolníků izolovanými substancemi mohou být provázeny nepříznivými projevy, jimž lze předcházet pouze desenzibilizací imunizovaných jedinců. Závažným problémem imunizace dobrovolníků jsou opatření směřující k prevenci rozšiřování choroby AIDS. Je zřejmé, že dosud užívaný způsob přípravy diagnostik anti-A kladé značné nároky na materiální, kádrové, metodické i organizační zajištění výrobního procesu.

Vedle žádaných protilátek proti skupinovému antigenu A se v séru každého záměrně imunizovaného i neimunizovaného dárce, jehož organismus je nepřetržitě vystaven nejrozličnějším anigenním podnětům, vyskytují v heterogenní - složením 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 nezbytné ze séra odstranit. Standardizace jednotlivých šarží diagnostických sér je při stávajícím způsobu přípravy obtížná a vždy neúplná, protože 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.

Mnohé z uvedených problémů dosud používaného postupu přípravy diagnostických lidských sér anti-A je možné odstranit zavedením přípravy monoklonálních protilátek anti-A, produkovaných lymfocytárními hybridomy.

Hybridomy produkující monoklonální protilátky proti lidskému skupinovému antigenu A již byly připraveny v řadě zemí. Monoklonální protilátky anti-A komerčně dostupné například od firem Celtech (Velká Británie), Serotec (Velká Británie), Biotest-Diagnostics (NSR) a Diagnostics Pasteur (Francie), jsou postupně zaváděny do klinické praxe jako serologická typizační diagnostika skupinového antigenu A.

Také v Československé socialistické republice byla připravena řada lymfocytárních hybridomů produkujících monoklonální protilátky proti lidskému skupinovému antigenu A. Některé z nich se již staly předmětem přihlášky vynálezu a autorské ochrany. Jde o hybridomy HE-O2 (čs. autorské osvědčení č. 228 859), HE-18 (čs. autorské osvědčení číslo 229 996) a HE-24 (čs. autorské osvědčení č. 229 995), produkující monoklonální protilátky využitelné ve zdravotnické praxi k bezpečnému odlišení erytrocytů A₁B od erytrocytů A₂B a hybridomy HE-10 (čs. autorské osvědčení č. 260 746) a HE-14 (čs. autorské osvědčení č. 260 748), produkující monoklonální protilátky využitelné k detekci skupinového antigenu A na tkáňových řezech při imunohistochemické diagnostice nádorových one-

mocnění epiteliálních tkání - například sliznic tlustého střeva. Z hlediska širokého využití ve zdravotnické praxi jsou mezi monoklonálními protilátkami proti lidskému skupinovému antigenu A nejvýznamnější ty protilátky, které v hemaglutinačních testech, užívaných k typizaci skupinové příslušnosti v ABO systému, reagují s erytrocyty A_2B a splňují specifitu, účinnost a aviditou podmínky oborové normy ON 86 4511 ministerstva zdravotnictví ČSR pro diagnostikum anti-A. V ČSSR se předmětem přihlášky vynálezu dosud stal jediný lymfocytární hybridom, produkuje monoklonální protilátku výše uvedených vlastností - hybridom HE-195. Vzhledem k zásadnímu významu monoklonálních diagnostik anti-A, vyhovujících oborové normě ON 86 4511, ve zdravotnické praxi a ke skutečnosti, že potřebám velkokapacitní kultivace hybridomů, jež se po převedení hybridomové technologie do výrobních podmínek stane rozhodujícím způsobem přípravy monoklonálních diagnostik ABO systému, neodpovídají různé hybridomy stejnou měrou, je žádoucí zajistit úspěšnou výrobu diagnostik anti-A několika hybridomy, produkujícími monoklonální protilátky potřebných vlastností.

Dalším hybridomem produkuje monoklonální protilátku proti lidskému skupinovému antigenu A, který odpovídá požadavkům oborové normy ON 86 4511 pro diagnostikum anti-A, je lymfocytární hybridom, uložený ve sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV v Praze 4, Vídeňská 1083 pod označením IMG CZAS HE-193.

Uvedený hybridom byl získán způsobem známým z odborné literatury (Köhler G., Milstein C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* 256: 495, 1975; Galfré G., Howe S. C., Milstein C., Butcher G. W., Howard J. C.: Antibodies to major histocompatibility antigen produced by hybrid cell lines, *Nature* 266: 550, 1977; Fazekas de St. Groth S., Scheidigger D.: Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics, *J. Immunol. Meth.* 35: 1, 1980) klonováním souboru hybridních buněk, vzniklých fúzí buněk myši myelomové linie Sp2/O-Ag 14 a buněk získaných ze sleziny myši kmene BALB/c imunizované glykolipidy připravenými z lidských erytrocytů krevní skupiny A_2 .

Lymfocytární hybridom HE-193 produkuje monoklonální protilátku proti skupinovému antigenu A, která reaguje s lidskými typovými erytrocyty A_1 , A_1B , A_2 , A_2B a nereaguje s erytrocyty B a O. Hybridom HE-193 je možné kultivovat v podmínkách in vitro v kultivačních médiích vhodných pro živočišné (savčí) buňky nebo v podmínkách in vivo v peritoneální dutině myši kmene BALB/c. Hybridom HE-193 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 k imunizaci. Monoklonální protilátka produkovaná hybridomem HE-193 je specifická pro antigeny krevní skupiny člověka A a je prostá jakýchkoliv balastních protilátek.

Příklad:

Za účelem pomnožení buněk hybridomu HE-193 v podmínkách in vitro bylo vpraveno $1,5 \times 10^6$ hybridomových buněk do kultivační láhve Legroux obsahující 20 ml kultivačního média RPMI obsahujícího 10 % fetálního telecího séra. Po třech dnech růstu kultury hybridomových buněk bylo z láhve získáno kultivační médium obohacené o monoklonální protilátku HE-193 uvolňovanou do média hybridomovými buňkami. Účinnost monoklonální protilátky HE-193 byla testována makrotitrací v aglutinačních zkouškách postupným dvojnásobným ředěním kultivačního média obsahujícího monoklonální protilátku izotonickým roztokem chloridu sodného podle společné oborové normy ON 86 4500. Výsledky vyšetření účinnosti protilátky HE-193 se souborem typových erytrocytů a srovnání s minimálně přijatelnými titry podle oborové normy ON 86 4511 jsou uvedeny v tabulce č. 1.

TABULKA č. 1

Výsledky serologického vyšetření kultivačního média obsahujícího monoklonální protilátku HE-193 podle ON 86 4500

Krvinky skupiny	Počet vyšetření	Průměrný titr	Minimální přijatelný titr podle ON 86 4511
A ₁	23	256 +	256 +
A ₂	5	256 +	128 +
A ₁ B	5	256 +	256 +
A ₂ B	5	32 ++	32 +
A ₃	-	netestováno	norma nevyžaduje +/

+/ diagnostické sérum anti-A SEVAC dosahuje s krvinkami A₃ titru 4 +.

Ze souboru vyšetření, jejichž výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 1 vyplývá, že kultivační médium obsahující monoklonální protilátku HE-193 splňuje podmínky oborové normy MZ ČSR ON 86 4511 pro skupinové diagnostické sérum anti-A.

Avidita monoklonální protilátky HE-193 byla testována na podložním skle smícháním 10% suspenze typových krvinek v izotonickém roztoku chloridu sodného se stejným množstvím kultivačního média obsahujícího monoklonální protilátku a stanovením reakčního času podle čl. 9 společné oborové normy ON 86 4500. Příklad výsledků vyšetření avidity protilátky HE-193 s typovými erytrocyty a srovnání s maximálními přijatelnými reakčními časy podle oborové normy ON 86 4511 jsou uvedeny v tabulce č. 2.

TABULKA č. 2

Výsledky vyšetření avidity kultivačního média obsahujícího monoklonální protilátku HE-193 podle ON 86 4500

Krvinky skupiny	Reakční čas x/	Maximální přijatelný čas xx/
A ₁	15 s	15 s
A ₂	17 s	30 s
A ₁ B	15 s	30 s
A ₂ B	15 s	45 s

x/ průměrná hodnota ze 3 měření

xx/ podle oborové normy ON 86 4511

Z výsledků uvedených v tabulce č. 2 vyplývá, že kultivační médium obsahující monoklonální protilátku HE-193 splňuje požadavky oborové normy MZ ČSR ON 86 4511 na aviditu skupinového diagnostického séra anti-A.

S typovými erytrocyty B (7 vyšetření) a O (13 vyšetření) kultivační médium obsahující monoklonální protilátku HE-193 nereagovalo.

Buňky hybridomu HE-193 mají morfologický obraz typických myších myelomových buněk. V podmínkách in vitro rostou v podobě polosuspenzních kultur. Základním kultivačním médiem je RPMI 1640 doplněné podle běžné receptury penicilinem, streptomycinem, gentamycinem, pufrem HEPES, 2-merkaptotanolem, L-glutaminem, pyruvát sodným a fetálním telecím sérem. Hybridom je kultivován při 37 °C. Střední generační čas je 16,2 hodiny a modální počet chromosomů byl 14 měsíců po sestrojení hybridomu 83 chromosomů. Produkováná monoklonální protilátka je myší imunoglobulin třídy IgM.

Monoklonální protilátka produkovaná myším lymfocytárním hybridomem HE-193 může být ve zdravotnické praxi využita jako diagnostikum antigenu krevní skupiny A.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS HE-193, produkující monoklonální protilátku třídy IgM proti antigenu lidské krevní skupiny A.