



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

261297

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 20 07 87
(21) PV 5458-87.D

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 5/00

(40) Zveřejněno 15 06 88

(45) Vydáno 15 06 89

(75)

Autor vynálezu

VIKlický VLADIMÍR MUDr. CSc., PRAHA, DŘÍMALOVÁ DAGMAR MUDr.,
VAŇÁK JAN MUDr., OLOMOUC, NĚMEC MILOŠ RNDr. CSc., PRAHA

(54) Myší lymfocytární hybridom produkující protilátku proti lidskému krevně skupinovému antigenu B

Řešení se týká myšího lymfocytárního hybridomu, produkujícího protilátku proti lidskému krevně skupinovému antigenu B, uloženého ve sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV pod označením IMG ČZAS HEB-29. Monoklonální protilátka hybridomu HEB-29 je využitelná jako rutinní diagnostikum k sérologickým vyšetřováním lidského krevního skupinového antigenu B.

Vynález se týká nového hybridomu, to je hybridního jednobuněčného organismu, sestrojeného fúzí buňky myší myelomové linie Sp 2/0 a myší slezinné lymfoidní buňky produkující protilátku proti lidskému erytrocytárnímu skupinovému antigenu B.

Diagnostická séra proti lidskému erytrocytárnímu skupinovému antigenu B /zkráceně diagnostická séra anti-B/ 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 např. jako základní součást úplného předtransfúzního vyšetření, kontroly krevní skupiny u lůžka při začátku transfúze, sérologických vyšetřování rodiček a vyšetřování novorozenců.

Diagnostická séra anti-B se dosud většinou připravují z lidské krve vybraných dárců, u nichž byly předem prokázány přirozené vysoké hodnoty aglutininů anti-B nebo z krve dobrovolných dárců záměrně imunizovaných slinami vylučovatelů skupinově specifické substance B, příp. substancí B připravenou z lidských slin nebo zvířecího materiálu - např. žaludeční mukózy prasat či koní. Substance užívané k imunizaci lidských dobrovolných dárců 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, jimž lze předcházet pouze desenzibilizací imunizovaných jedinců. Dosud užívaný způsob přípravy diagnostických sér anti-B klade tedy značné nároky na materiální, kádrové, metodické i organizační zajištění výrobního procesu.

Vedle žádaných protilátek anti-B se v séru každého záměrně imunizovaného i neimunizovaného dárce 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, neboť z vlastní podstaty dosavadní přípravy sér vyplývá nemožnost získat dvě výrobní šarže stejných vlastností. Nepříznivým rysem dosavadního způsobu přípravy diagnostických sér anti-B je spotřeba velkých množství lidské krve.

Mnohé z uvedených problémů dosud používaného postupu přípravy diagnostických lidských sér anti-B a řadu obtíží vyplývajících z nepříznivých vlastností současných diagnostických sér je možné odstranit zavedením přípravy myších monoklonálních protilátek anti-B, produkovaných lymfocytárními hybridomy.

Podobné hybridomy produkující protilátky byly připraveny v řadě zemí a v některých z nich jsou již komerčně dostupné a začínají se používat v klinické serologické praxi. Jde např. o výrobky firem Serotec (Anglie), Immunotech (Francie), Biotest-Diagnostics (NSR), Diagnostics Pasteur (Francie), Celtech (Anglie). Nabízené protilátky v zahraničí jsou určeny pro serologické vyšetření krevních skupin. V Československu byly připraveny a jsou chráněny hybridomy HEB-20 a HEB-27, produkující protilátky proti krevně skupinovému antigenu B, vhodné pouze k použití v imunohistochemii a nevhodné pro použití v sérologii.

Uvedený nedostatek odstraňuje hybridom, uložený ve sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV v Praze 4, Vídeňská ul. 1 083 pod označením IMG HEB-29, který je zdrojem monoklonální protilátky proti lidskému erytrocytárnímu skupinovému antigenu B. Uvedený hybridom byl získán způsobem známým z odborné literatury (Fazekas de St. Groth, S., Scheidigger, O.: Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics, J. Immunol. Meth.: 35: 1, 1980; Galfré, G., Howe, S. S., 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 Sp 2/0 a buněk, získaných ze sleziny myší F₁ /BALB/c x B 10.A/, imunizovaných erytrocyty skupiny B.

Lymfocytární hybridom HEB-29 produkuje zcela homogenní protilátku, tzv. protilátku monoklonální, specificky reagující s lidskými typovými erytrocyty B, A₁B a A₂B, která nereaguje s erytrocyty A₁, A₂ a 0. Hybridom HEB-29 je možné kultivovat v podmínkách in vitro v kultivačních médiích vhodných pro živočišné buňky nebo v podmínkách in vivo v peritoneální dutině myši /BALB/c x B 10.A/F₁. Hybridom HEB-29 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 HEB-29 je specifická pro lidský erytrocytární skupinový antigen B a je prostá jakýchkoliv balastních protilátek.

Monoklonální protilátka HEB-29 tvoří základ diagnostika, které plně odpovídá všem požadavkům současné oborové normy pro diagnostická séra anti-B /tj. avidita 15 sekund s celou krví v podmínkách kontroly u lůžka, minimální titr ve zkumavkovém hemaglutinačním testu 256 a účinnost při vyšetření aglutinogenu B sklíčkovou, destičkovou i zkumavkovou metodou/. Růstové a produkční vlastnosti hybridomu jsou velmi dobré a při srovnání se zahraničními protilátkami jsou základem pro ekonomicky výhodné využití protilátky HEB-29 jako základu komerčně připravovaného a prodáváného testovacího diagnostika.

P ř í k l a d

Za účelem pomnožení buněk hybridomu HEB-29 v podmínkách in vitro bylo vpraveno 1×10^6 hybridomových buněk do kultivační lahve Legroux obsahující 20 ml kompletního kultivačního média RPMI s fetálním telecím sérem /7%/. Po třech dnech růstu kultury hybridomových buněk bylo z láhve získáno kultivační médium obohacené o monoklonální protilátku HEB-29 uvolňovanou do média hybridomovými buňkami.

Účinnost monoklonální protilátky HEB-29 byla testována postupným dvojnásobným ředěním 5krát zahuštěného kultivačního média obsahujícího monoklonální protilátku v prostředí izotonického roztoku chloridu sodného v aglutinačních zkumavkách podle oborové normy ON 84 3225. Zahuštěné kultivační médium aglutinovalo na + /podle ON 84 3225/ erytrocyty B v ředění 1:256. S erytrocyty A₁, A₂ a 0 zahuštěné kultivační médium obsahující monoklonální protilátku HEB-29 nereagovalo.

Avidita monoklonální protilátky HEB-29 byla testována s 10% suspenzí erytrocytů B nebo A₁B jednou promytých a suspendovaných v izotonickém roztoku chloridu sodného na čistém podlotním skle podle oborové normy ON 86 4511. K počátku aglutinace erytrocytů B od různých dárců docházelo za 5 až 14 sekund k počátku aglutinace erytrocytů A₁B od různých dárců za 8 až 15 sekund.

T a b u l k a

Srovnání účinnosti a avidity monoklonální protilátky HEB-29 s reaktivitou monoklonálních protilátek anti-B produkovaných hybridomy dosud přihlášenými v ČSSR jako vynálezy

Protilátka	Erytrocyty				
	B	A ₁ B titr/čas	A ₁	A ₂	0
HEB-29	256+/5-14s	256+/8-15s	-	-	-
HEB-20	32+/300s	16+/300s	-	-	-
HEB-27	16+/45-150s	16+/55-200s	-	-	-
diagnost. sérum anti-B SEVAC	256+/7-15s	256+/9-25s	-	-	-

Buňky hybridomu HEB-29 mají ultrastrukturální obraz typických myelomových buněk, kde převažující organelou jsou volné a na membrány vázané polyribosomy. V podmínkách in vitro rostou v podobě polosuspenzních kultur. Základními kultivačními médii jsou RPMI nebo Eaglovo minimální esenciální médium s Hanksovou solnou směsí, doplněná o neesenciální aminokyseliny, L-glutamin /3mM/ a pyruvát sodný /1mM/ /médium označované jako H-MEMd, Ústav molekulární genetiky ČSAV/. Média jsou pro kultivaci hybridomu HEB-29 doplněna penicilinem, streptomycinem, 2-merkaptotetanolem / 5×10^{-5} M/, pufrem HEPES /2 až 4×10^{-3} M/ a inaktivovaným bovinním sérem pro TK /Bioveta n.p., Ivanovice na Hané, 10%/. Pro získávání kultivačního média obohaceného o monoklonální protilátku HEB-29 /supernatantu kultury hybridomových buněk/ k diagnostickým účelům je v kultivačním médiu nahrazeno inaktivované bovinní sérum fetálním telecím sérem /5 až 10%/.

Hybridom HEB-29 je kultivován při 37 °C. Střední generační čas je 15,5 hodin, modální počet chromosomů 40 měsíců po sestrojení /fúzi/ je 84 chromosomů. Produkovaná protilátka je myší imunoglobulin třídy IgM, kappa.

Monoklonální protilátka produkovaná myším lymfocytárním hybridomem HEB-29 může být využita ve zdravotnické praxi k rutinním serologickým vyšetřováním lidského krevního skupinového antigenu B.

P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS HEB-29, produkující monoklonální protilátku třídy IgM proti lidskému erytrocytárnímu skupinovému antigenu B.