



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIŠ VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

260746
(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 5/00

(22) Přihlášeno 15 06 87

(21) (PV 4350-87.E)

(40) Zveřejněno 16 05 88

(45) Vydáno 15 05 89

(75)

Autor vynálezu

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

(54) Myší lymfocytární hybridom produkující protilátku proti lidskému erytrocytárnímu skupinovému antigenu A

1

2

Řešení se týká myšího lymfocytárního hybridomu, produkujícího protilátku proti lidskému erytrocytárnímu skupinovému antigenu A, uloženého ve sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV pod označením HE-10. Monoklonální protilátka hybridomu HE-10 je vhodná jako součást diagnostického panelu obsahujícího také monoklonální protilátky HE-14, HEB-20 a HEB-27 k upřesnění patologicko-anatomické diagnózy nádorových onemocnění tenkého a tlustého střeva.

Vynález se týká nového hybridomu, tj. hybridního jednobuněčného organismu, sestaveného fúzí buňky myši myelomové linie P3-X63-Ag8.653 a myši slezinové lymfocytární buňky produkující protilátku proti lidskému erytrocytárnímu skupinovému antigenu A.

Diagnostická séra proti lidskému erytrocytárnímu skupinovému antigenu A (zkráceně diagnostická séra anti-A) 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 krevní transfúze, sérologických vyšetřování rodiček a vyšetřování novorozenců.

Výskyt antigenů krevně skupinového systému ABO není omezen pouze na erytrocytární membrány. Ve formě glykoproteinů se nacházejí např. v sekretech žláзовých buněk gastrointestinálního, genitálního a respiračního traktu. Antigeny sacharidové struktury jsou rovněž součástí buněčných membrán epitelální tkáně, přičemž pozornost se soustřeďuje na změny v expresi těchto antigenů v souvislosti s vývojovými, diferenciálními a zejména nádorovými procesy. Značný počet imunohistochemických studií prokázal, že např. u karcinomů plic, žaludku, prostaty a močového měchýře dochází ke ztrátě A a B isoantigenů, které jsou normálně přítomny ve zdravé epitelální tkáni.

Krevně skupinové antigeny A a B jsou přítomny také v epitelálních buňkách sliznice tlustého střeva lidského plodu. Po narození zůstávají zachovány v proximální části, rychle však mizí v distální části tračníku. Krevně skupinové antigeny se znovu objevují u distálně lokalizovaných karcinomů — např. v esovité kličce a rektu — a stávají se významným diagnostickým znakem rozvoje nádoru.

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, příp. substancí A připravenou z lidských slin nebo zvířecího materiálu — např. žaludeční mukózy prasat či koní. Substance užívané k imunizaci lidských dobrovolníků 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-A klade tedy značné nároky na materiální, kadrové, metodické i organizační zajištění výrobního procesu.

Vedle žádaných protilátek anti-A se v séru každého záměrně imunizovaného i neimunizovaného dárce, jehož organismus je nepřetržitě vystaven nejrůznějším antigenním 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, neboť 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 i řadu obtíží vyplývajících z nepříznivých vlastností současných diagnostických sér je možné odstranit zavedením přípravy myších monoklonálních protilátek anti-A, produkovaných lymfocytárními hybridomy.

Takovéto hybridomy produkující protilátky byly připraveny v řadě zemí i v ČSSR a v některých zemích jsou již komerčně dostupné a začínají se používat v klinické sérologické praxi.

Jde např. o výrobky firem:

Serotec (Anglie),
Immunotech (Francie),
Biotest-Diagnostics (NSR),
Diagnostics Pasteur (Francie),
Celtech (Anglie).

V ČSSR dosud chráněné hybridomy (HE-24 AO 229 996, HE-02 AO 228 859, HE-18 AO 229 996), produkují protilátky nevhodné pro použití v imunohistochemii. Nabízené protilátky v zahraničí jsou určeny pro sérologické vyšetření krevních skupin. Žádná z uvedených zahraničních firem neuvádí možnost využití nabízených protilátek v imunohistochemii.

Uvedené nevýhody odstraňuje hybridom, uložený ve sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV v Praze 4, Vídeňská ul. 1083 pod označením IMG CZAS HE-10, který je zdrojem monoklonální protilátky proti lidskému erytrocytárnímu skupinovému antigenu A.

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 myši myelomové linie P3-X63-Ag8.653 a buněk, získaných ze sleziny myši kmene BALB/c, imunizovaných slinami vylučovatele skupinově specifické substance A.

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

Příklad

Za účelem pomnožení buněk hybridomu HE-10 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 (10%) (ÚMG ČSAV). Po třech dnech růstu kultury hybridomových buněk bylo z lahve získáno kultivační médium obohacené o monoklonální protilátku HE-10 uvolňovanou do média hybridomovými buňkami. Účinnost monoklonální protilátky HE-10 byla testována postupným dvojnásob-

ným ředěním kultivačního média obsahujícího monoklonální protilátku v prostředí izotonického roztoku chloridu sodného v aglutinačních zkumavkách podle oborové normy ON 84 3225. Kultivační médium aglutinovalo na + (podle ON 84 3225) erytrocyty A₁ v ředění 1:16, erytrocyty A₁B v ředění 1:16, erytrocyty A₂ v ředění 1:8. S erytrocyty A₂B, B a O kultivační médium obsahující monoklonální protilátku HE-10 nereagovalo. Aglutinace erytrocytů A₁ a A₁B protilátkou HE-10 nebyla inhibována N-acetyl-D-galaktosaminem.

Pro testování reaktivity protilátky HE-10 na tkáňových řezech byly biotické vzorky odebírány z několika míst tlustého střeva, fixovány ve formaldéhydu a zality do parafinu. Po odparafinování řezů byla aplikována protilátka HE-10 (naředěný supernatant) a její vazba na terčové struktury byla sledována pomocí prasečí protilátky proti myšimu imunoglobulinu značené křenovou peroxidázou (Ústav sér a očkovacích látek, Praha).

Protilátka HE-10 výrazně barvila na řezech z normální tkáně oblast okolo jádra v buňkách epitelu krypt s maximem v proximální části tlustého střeva a vymizením pozitivitu v oblasti esovité kličky a konečníku. Pozitivní reakce se projevila v oblasti distálního tračníku pouze ve vzorcích z nádorové tkáně (adenokarcinom sigmoidea).

Významné je, že protilátka HE-10 dává též pozitivní reakci v supranukleární oblasti některých buněk epitelu ležících v blízkosti nádorových ložisek a klasifikovaných běžnými histologickými přístupy jako zcela normální buňky. Obraz získaný při použití protilátky HE-14 je zásadně odlišný; buňky jsou barveny difúzně a pozitivní reakce je pouze v nádorových buňkách. Výsledky srovnání reaktivity jednotlivých MP jsou shrnuty v tabulce.

Tabulka

Reaktivita monoklonálních protilátek v tkáňových řezech¹ pacientů s krevní skupinou A

Monoklonální protilátka	Cílový antigen	Tračník	Distální tračník	Adenokarcinom distálního tračníku
HE-10	A	+ ²	—	+ ²
HE-14	A	+	—	+
HE-02	A	—	—	—
HE-18	A	—	—	—
HE-24	A	—	—	—
HEB-20	B	—	—	—

Poznámka:

¹ fixace formolem, zalití do parafinu

² lokalizace v buňkách v oblasti Golgiho aparátu

Buňky hybridomu HE-10 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 esenciální médium s Hanksovou solnou směsí, doplněné o neesenciální aminokyseliny, L-glutamin (3mM) a pyruvát sodný (1mM) (médium označované jako H-MEMd, Ústav molekulární genetiky ČSAV).

Média jsou pro kultivaci hybridomu HE-10 doplněna penicilinem, streptomycinem, 2-merkaptoetanolem (5×10^{-5}), puforem 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 HE-10 (supernatantu kultury hybridomových buněk) k diagnostickým účelům je v kultivačním médiu nahrazeno inaktivní bovinní sérum fetálním telecím sérem.

Hybridom HE-10 je kultivován při 37 °C. Střední generační čas je 18 hodin, modální počet chromosomů 20 měsíců po sestrojení (fúzi) je 82 chromosomů. Produkováná monoklonální protilátka je myší imunoglobulin třídy IgM, kappa.

Monoklonální protilátka produkovaná myším lymfocytárním hybridomem HE-10 může být využita ve zdravotnické praxi jako součást diagnostického panelu obsahujícího také monoklonální protilátky HE-14, HEB-20 a HEB-27 k upřesnění patologicko-anatomické diagnózy nádorových onemocnění tenkého a tlustého střeva.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS HE-10, produkující monoklonální protilátku

proti lidskému erytrocytárnímu skupinovému antigenu A třídy IgM.