



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

228856
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 5/00

(22) Přihlášeno 10 08 82
(21) (PV 5929-82)

(40) Zveřejněno 15 09 83

(45) Vydáno 15 08 86

(75)
Autor vynálezu

NĚMEC MILOŠ RNDr. CSc., FRANĚK FRANTIŠEK RNDr. DrSc.,
člen korespondent ČSAV, VIKLICKÝ VLADIMÍR MUDr. CSc., PRAHA

(54) Myší lymfocytární hybridom produkující protilátku proti prasečímu imunoglobulinu G

1

Vynález se týká nového hybridomu, tj. hybridního jednobuněčného organismu, sestaveného buněčnou fúzí myší myelomové linie P3-X63-Ag8.653 a myší slezinové lymfocytární buňky, produkující protilátku proti prasečímu imunoglobulinu G.

Dosud se protilátky proti imunoglobulinu G vyrábějí tak, že je imunoglobulin G opakovaně injikován jako antigen pokusným zvířatům, nejčastěji králíkům nebo koním. Sérum takto imunizovaných zvířat, odebrané po určité době působení antigenu, slouží jako zdroj protilátek, užívaných zejména pro kvalitativní nebo kvantitativní analýzu imunoglobulinu ve výzkumu a v imunodiagnostické praxi. Tento postup, nazývaný konvenční imunizací, má několik nevýhod. V séru imunizovaných zvířat se nachází heterogenní směs protilátek, jejichž spektrum je v každém jednotlivém organismu různé a neopakovatelné. Organismus zpravidla vytvoří kromě protilátek vůči žádanému antigenu i protilátky proti nečistotám antigenního preparátu; ty je nutné ze sér odstraňovat vysycováním. Výrobní šarže konvenčních sér se proto dají těžko standardizovat a vycházejí z výroby v širokém rozmezí kvality. Pro výrobu každé šarže je třeba připravit čistý imunizační antigen a další anti-

2

geny pro vysycení balastních protilátek proti nečistotám.

Uvedené nedostatky výše zmíněného a dosud používaného postupu odpadnou, je-li k dispozici hybridom, produkující monoklonální protilátky proti prasečímu imunoglobulinu G, uložený ve Sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV v Praze 4, Vídeňská č. 1083, pod označením IMG CZAS PGG-02.

Uvedený hybridom byl získán způsobem známým z odborné literatury (Fazekas de St. Groth, S., Scheidigger, 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, vzniklých fúzí myší myelomové linie P3-X63-Ag8.653 a buněk, získaných ze sleziny myší kmene Balb/c, imunizovaných prasečím imunoglobulinem G.

Výhodou hybridomu je, že produkuje homogenní protilátku, tzv. protilátku monoklonální, která je schopna specificky reagovat s prasečím imunoglobulinem G. Hybridom PGG-02 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.

Příklad

Za účelem pomnožení hybridomových buněk in vivo bylo aplikováno $1,4 \times 10^6$ buněk do peritoneální dutiny myši. Aby došlo k lepšímu uchycení aplikovaných buněk, byla myš 18 dní před přenosem buněk hybridomu ovlivněna parafinovým olejem (0,4 ml intraperitoneálně). Po 16 dnech růstu hybridomu v peritoneální dutině byla myš zabita a naprodukována ascitická tekutina odebrána. Celkem bylo získáno 6,2 ml ascitické tekutiny, která obsahovala 11 mg/ml imunoglobulinu. Ascitická tekutina obsahující produkt hybridomu PGG-02 byla smísená ve stejných objemech s acitickou tekutinou obsahující produkt hybridomu PGG-05. Směs těchto dvou monoklonálních protilátek poskytovala precipitát s prasečím imunoglobulinem G ve dvojité imunodifúzi v agarovém gelu.

Buňky hybridomu PGG-02 mají ultrastrukturální obraz typický myelomových buněk, kde převažující organelou jsou volné a na membrány vázané polyribosomy. In vitro rostou jako polosuspenní kultury. Základním kultivačním médiem je Eaglovo minimální esenciální médium s Hanksovou solnou směsí a doplněné o neesenciální aminokyseliny, L-glutamin (3 mM), pyruvát sodný (1 mM). Toto médium (označované jako H-MEMd, Ústav molekulární genetiky ČSAV), je pro kultivace hybridomu PGG-02 doplněno penicilinem, streptomycinem, gentamycinem, 2-merkaptioethanolem (0,05 mM) pufrům HEPES (10 mM) a inaktivovaným boviním sérem (Bioveta, Ivanovice na Hané, 10%). Hybridom je kultivován při 37 °C. Střední generační čas je 17,2 hod. a 8 měsíců po sestrojení byl modální počet chro-

mosomů 81. Produkovaná protilátka je monoklonální imunoglobulin podtřídy IgG1.

Monoklonální protilátka, produkovaná hybridomem PGG-02 poskytuje ve směsi s monoklonální protilátkou produkovanou hybridomem PGG-05 precipitát s prasečím imunoglobulinem G a též s Fc fragmentem prasečího imunoglobulinu G. Fc fragment získaný limitovanou enzymatickou hydrolýzou trypsinem je složen z C-koncových polovin polypeptidického řetězce γ , tj. těžkého řetězce imunoglobulinu G. Fc fragment obsahuje pouze konstantní části řetězce γ , které charakterizují imunoglobulin třídy G. Precipitace fragmentu Fc je důkazem, že monoklonální protilátka produkovaná hybridomem PGG-02 je zaměřena proti antigenní determinantě lokalizované v části molekuly imunoglobulinu tvořící Fc fragment.

Hybridom PGG-02 může být průmyslově využíván jako zdroj protilátky proti prasečímu imunoglobulinu G v metodách analytických nebo preparativních. Protože protilátka je specifická pro konstantní část těžkého řetězce imunoglobulinu G, může sloužit k identifikaci imunoglobulinu třídy G a k jeho kvantitativní analýze. Ve směsi s monoklonální protilátkou PGG-05 se dá použít pro kvantitativní analýzu metodou radiální imunodifúze v gelu. Další možné použití je ve funkci druhé protilátky, tj. protilátky proti protilátce v imunochemických a imunologických metodách v případech, kdy první protilátka je konvenční protilátka připravená imunizací pokusných prasat. V imunohistologických a imunohistochemických metodách využívajících optického nebo elektronového mikroskopu se použije monoklonální protilátka samotná po konjugaci s fluorescenčními látkami, enzymy, feritinem nebo biotinem. Pro vytvoření precipitátu druhou protilátkou, například v radioimunoanalýze, nebo pro vytvoření zákalu, například v imunonefelometrii, se použije monoklonální protilátka PGG-02 ve směsi s monoklonální protilátkou PGG-05.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS PGG-02, produkující monoklonální protilát-

ku podtřídy IgG1 proti prasečímu imunoglobulinu.