

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

243652

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 01 02 84
(21) PV 741-84

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 5/00
G 01 N 33/53

(40) Zveřejněno 17 09 85

(45) Vydáno 15 07 87

(75)
Autor vynálezu

VIKLICKÝ VLADIMÍR MUDr. CSc.; DRÁBER PAVEL RNDr.;
MACKŮ BLANKA Pharm. Dr.; VACHOUTOVÁ EDUARDA RNDr., PRAHA

(54) Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS HP-03

Myší lymfocytární hybridom, produkující protilátku proti křenové peroxidáze, uložený ve Sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV pod označením HP-03. Monoklonální protilátka hybridomu HP-03 je vhodná pro použití v enzymoimunologické a radioimunologické analýze a k přípravě peroxidáza-antiperoxidáza komplexu.

Výsledky se týká nového hybridomu, tj. hybridního jednobuněčného organismu, sestaveného fúzí buněk myši myelomové linie P3-X63-Ag8.653 a myši slezinové lymfoidní buněk, produkující protilátku proti křenové peroxidáze.

Doposud se protilátky proti křenové peroxidáze vyrábějí tak, že je křenová peroxidáza opakovaně injikována jako antigen pokusným zvířatům, nejčastěji králíkům a prasatům. Sérum takto imunizovaných zvířat, odebírané po určité době působení antigenu, slouží jako zdroj protilátek, užívaných zejména pro přípravu komplexu peroxidáza anti-peroxidáza používaného k detekci antigenů, zejména v tkáňových řezech.

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 spravidla vytváří 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 antigeny pro vysycení balastních protilátek proti nečistotám.

Uvedené nedostatky výše zmíněného a dosud používaného postupu odpadnou, je-li k dispozici hybridom, produkující monoklonální protilátku IgG1 proti křenové peroxidáze, uložený ve Sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV v Praze 4, Václavská 1083, pod označením IMG CZAS HP-03.

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; Glafre, 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) klonování souboru hybridních buněk, vzniklých fúzí buněk myši myelomové linie P3-X63-Ag8.653 a buněk, získaných ze sleziny myši kmene C57B1/10 (B 10), imunizovaných křenovou peroxidázou.

Výhodou hybridomu je, že produkuje homogenní protilátku, tsv. protilátku monoklonální, která je schopna specificky reagovat s křenovou peroxidázou. Hybridom HP-03 je možné kultivovat in vitro v mediích vhodných pro živočišné buňky a je adaptován pro růst in vivo v peritoneální dutině myši F₁ (B10xBALB/c).

Z konserv, uchovávaných v kapalném dusíku, je možné zahájit produkci protilátky bez dalšího antigenu. Protilátka, produkovaná hybridomem HP-03 reaguje specificky s křenovou peroxidázou a vytváří s ní stabilní komplex, využitelný pro detekci antigenů v enzymoimunologických testech.

P ř í k l a d

Za účelem pomnožení hybridomových buněk in vivo bylo aplikováno 2×10^6 buněk do peritoneální dutiny myši. Aby došlo k lepšímu uchycení aplikovaných buněk, byla myš 14 dní před přenosem buněk hybridomu ovlivněna parafinovým olejem (0,5 ml intraperitoneálně).

Po 16 dnech růstu hybridomu v peritoneální dutině byla myš zabita a naprodukováná ascitická tekutina odebrána. Celkem bylo získáno 4,6 ml ascitické tekutiny, která obsahovala 13 mg/ml imunoglobulinu.

Monoklonální protilátka reagovala se specifickým antigenem v enzymoimunologickém testu

(při použití presečí antivyšší protilátky, značené křenovou peroxidázou) až do ředění 1 : 10⁷.

Buňky hybridomu HP-03 mají ultrastrukturální obraz typických 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 medium s Hanksovou solnou směsí doplněné o neesenciální aminokyseliny, L-glutamin (3 mM), pyruvát sodný (1 mM). Toto medium (označované jako H-MEMd) je pro kultivaci hybridomu HP-03 doplněno penicilinem, streptomycinem, gentamycinem, 2-merkapthoethanolem (0,05 mM) pufrům HEPES (10 mM) a inaktivovaným bovinním sérem (10%).

Hybridom je kultivován při 37 °C. Střední generační čas je 11,4 h a 3 měsíce po sestrojení byl modální počet chromosomů 83. Produkovaná protilátka je monoklonální imunoglobulin podtřídy IgG1, pI 6,6 až 7,2.

Monoklonální protilátka, produkovaná hybridomem HP-03 reaguje specificky s křenovou peroxidázou.

Hybridom (HP-03) může být průmyslově využíván jako zdroj monoklonální protilátky proti křenové peroxidáze v metodách analytických, preparativních nebo pro přípravu peroxidáza-anti-peroxidáza komplexu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS HP-03, produkující monoklonální protilátku imunoglobulin podtřídy IgG1 proti křenové peroxidáze.