



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

236 001

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 21 04 83
(21) PV 2869-83

(51) Int. Cl.³ C 12 N 5/00

(40) Zveřejněno 17 09 84
(45) Vydáno 01 02 87

(75)

Autor vynálezu

BÁRTEK JIŘÍ MUDr.

VERLOVÁ HANA ing.

DRÁBER PAVEL RNDr.

VIKLIČKÝ VLADIMÍR MUDr.CSc., PRAHA

(54) Myší lymfocytární hybridom produkující protilátku proti lidskému transferinu

Vynález se týká myšího lymfocytárního hybridomu, produkujícího protilátku proti lidskému transferinu, uloženého ve sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV pod označením HTF-14. Samotná monoklonální protilátka hybridomu HTF-14 je vhodná pro použití v enzymoimunologické a radioimunologické analýze. Směsi protilátek HTF-04, HTF-06 a HTF-14 nebo HTF-05, HTF-06 a HTF-14 jsou použitelné pro precipitační testy.

Vynález se týká nového hybridomu, tj. hybridního jednobuněčného organismu, sestrojeného fúzí buňky myší myelomové linie P3-X63-Ag.8653 a myší slezinné lymfoidní buňky, produkující protilátku proti lidskému transferinu.

Doposud se protilátky proti transferinu vyrábějí tak, že je transferin opakovaně injikován 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 kvantitativní stanovení plasmatického transferinu metodou jednoduché radiální imunodifuze. 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 antigeny pro vysycení balastních protilátek proti nečistotám.

Uvedené nedostatky výše zmíněného a dosud používaného postupu odpadnou, je-li k dispozici hybridom, produkující monoklonální protilátku proti lidskému transferinu, uložený ve Sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV v Praze 4, Vídeňské ul. 1083, pod označením IMG CZAS HTF-14.

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 buněk myši myelomové linie P3-X63-Ag8.653 a buněk, získaných ze sleziny myši kmene BALB/c, imunizovaných lidským transferinem.

Výhodou hybridomu je, že produkuje homogenní protilátku, tzv. protilátku monoklonální, která je schopna specificky reagovat s lidským transferinem. Hybridom HTF-14 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 konserv, uchovávaných v kapalném dusíku, je možné zahájit produkci protilátky bez dalšího antigenu. Protilátka, produkovaná hybridomem HTF-14 reaguje specificky s lidským a prasečím transferinem a není třeba se zbavovat protilátek balastních.

Příklad:

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 18 dní před přenosem buněk hybridomu ovlivněna parafinovým olejem /0.5 ml intraperitoneálně/. Po 17 dnech růstu hybridomu v peritoneální dutině byla myš zabita a naprodukováná ascitická tekutina odebrána. Celkem bylo získáno 3,8 ml ascitické tekutiny, která obsahovala 8 ml/ml imunoglobulinu. Protilátka reagovala se specifickým antigenem v enzymoimunologickém testu /při použití prasečí antimyší protilátky značené křenovou peroxidázou/ až do ředění $1:10^7$. Směsí protilátek HTF-04, HTF-06 a HTF-14, nebo HTF-05, HTF-06 a

HTF-14 jsou použitelné pro precipitační testy. Protilátka HTF-14 blokuje vazbu transferinu na transferinový receptor a křížově reaguje s prasečím transferinem, ve vazebných testech nereaguje s žádným lidským sérovým proteinem.

Buňky hybridomu HTF-14 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 /3mM/, pyruvát sodný /1mM/. Toto médium /označované jako H-MEMd, Ústav molekulární genetiky ČSAV/, je pro kultivaci hybridomu HTF-14 doplněno penicilinem, streptomycinem, gentamycinem, 2-merkaptostanolem /0,05 mM/ pufrem HEPES /10mM/ a inaktivovaným bovinním sérem /Bioveta, Ivanovice na Hané, 10%/. Hybridom je kultivován při 37°C. Střední generační čas je 12,0 hod. a 12 měsíců po sestrojení byl modální počet chromosomů 85. Produkovaná protilátka je monoklonální imunoglobulin podtřídy IgG1, kappa typu.

Monoklonální protilátka, produkovaná hybridomem HTF-14 reaguje specificky s lidským a prasečím transferinem.

Hybridom HTF-14 může být průmyslově využíván jako zdroj monoklonální protilátky proti transferinu v metodách analytických nebo preparativních.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

236 001

Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS HTF-14, produkující monoklonální protilátku podtřídy IgG1 proti lidskému transferinu.