



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

253 687

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 05 03 86
(21) PV 1501-86.D

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 5/00

(40) Zveřejněno 16 04 87
(45) Vydáno 14.6.1989

(75)
Autor vynálezu

HILBERT IVAN RNDr. CSc.,
HOŘEJŠÍ VÁCLAV RNDr. CSc.,
KRIŠTOFOVÁ HANA RNDr., PRAHA

(54)

Myší lymfocytární hybridom IMG OZAS MEM-57

Řešení se týká myšího lymfocytárního hybridomu, produkujícího protilátku proti membránovému antigenu lidských T buněk, uloženého ve sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky CSAV pod označením MEM-57. Samotná monoklonální protilátka hybridomu MEM-57 je vhodná pro použití v enzymoimunologické analýze nebo nepřímé imunofluorescenční analýze T3 antigenu T lymfocytů.

Vynález se týká nového hybridomu, to je hybridního jednobuněčného organismu, sestaveného fúzí buňky myší myelomové linie Sp2/O-Agl4 a myší slezinné lymfoidní buňky, produkující protilátku proti membránovému antigenu přítomnému na lidských T buňkách /tj. T lymfocytech/. T buňky mají základní důležitost v imunitním systému. Počet T buněk a jejich poměr k B lymfocytům se při imunodeficiencích a jiných patologických stavech liší od fyziologické normy.

Protilátky proti antigenům přítomným na určité subpopulaci buněk se nedají připravit přímou imunizací zvířat buněčnou suspensí lymfocytů nebo membránovou frakcí, to je konvenční imunizací. Konvenční imunizace má neodstranitelnou nevýhodu v tom, že séra obsahují protilátky proti mnoha membránovým antigenům, z nichž některé jsou přítomny na více typech buněk; séra proto nelze použít k jemnému rozlišení buněčných typů a tříd. Příprava čistého antigenu bez kontaminace jinými membránovými komponentami k imunizaci je pracná a většinou neúspěšná.

Nevýhody konvenčních sér proti membránovým antigenům v principu odstraňuje použití hybridomové technologie. Produkt hybridomu - monoklonální protilátka - je zaměřena vždy proti jediné antigenní determinantě. Je-li konstruován dostatečně velký soubor hybridomů, je pravděpodobné, že se z něho podaří vyhledat hybridom syntetizující protilátku, která rozeznává antigenní determinantu charakterizující určitý typ nebo třídu či podtřídu lymfocytů.

Je řada antigenů na T lymfocytech, které se liší molekulární hmotností, chemickou strukturou a fyziologickou funkcí.

K detailní analýze antigenů na T lymfocytech je nezbytně nutné mít protilátky proti co největšímu počtu membránových antigenů. Podle publikovaných výsledků /Kung, P.C., Talle, M.A., DeMaria, M.E., Butler, M.S., Lifter, J., Goldstein, G.: Strategies for generating monoclonal antibodies defining human T-lymphocyte differentiation antigens. Transplant. Proc. 12, Suppl. 1: 141-146, 1980/ se dá soudit, že lze připravit monoklonální protilátky specificky detegující různé antigeny T lymfocytů.

Podstatného pokroku v diagnostice lidských lymfocytů, projevujícího se vyšší spolehlivostí analytického výsledku, se dosáhne, je-li k dispozici hybridom, produkující monoklonální protilátku proti T3 antigenu přítomnému na lidských T buňkách, uložený ve Sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV v Praze 4, Vídeňská č. 1083, pod označením IMG CZAS MEM-57.

Uvedený hybridom byl získán způsobem známých z odborné literatury /Fazekas de St. Groth, S., Scheidegger, 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, získaných ze sleziny myši kmene BALB/c imunizovaných membránovou frakcí buněk lidských thymů.

Výhodou hybridomů je, že produkuje homogenní protilátku monoklonální, která je schopna specificky reagovat s lidskými T buňkami. Hybridom MEM-57 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 MEM-57, reaguje specificky s populacemi lidských T buněk a není třeba se zbavovat protilátek balastních.

Příklad

Za účelem pomnožení hybridomových buněk in vivo bylo apli-

kováno 3×10^6 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 10 dnech růstu hybridomu v peritoneální dutině byla myš uhubena a naprodukováná ascitická tekutina odebrána. Celkem bylo získáno 3 ml ascitické tekutiny, která obsahovala 5 mg/ml imunoglobulinu. Monoklonální protilátka reagovala specificky s T buňkami periferní krve v nepřímém enzy-moimunologickém testu. Monocyty, granulocyty a erytrocyty s protilátkou nereagovaly. Při použití čištěných populací T a B lymfocytů byla zjištěna reaktivita protilátky MEM-57 s více než 95 % T buněk a s méně než 5 % B buněk. Specifita protilátky je identická s komerční monoklonální protilátkou OKT-3, jak bylo prokázáno opakovanými paralelními stanoveními včetně použití směsí obou protilátek, a to jak v případě směsi periferních lymfocytů, tak u izolovaných T a B populací /viz tabulka/.

Tab. Reaktivita protilátek produkovaných hybridomem MEM-57 a OKT-3¹ s buňkami periferní krve

Buňky periferní lidské krve ²	% pozitivních buněk reagujících s monoklonální protilátkou v enzy-moimunologickém testu ³		
	MEM-57	OKT3	směs MEM-57 + OKT3
lymfocyty	70-80	70-80	70-80
T lymfocyty ⁴	95	95	95
B lymfocyty ⁵	5	5	5
monocyty	1	1	1
granulocyty	1	1	1
erytrocyty	1	1	1

¹Komerční monoklonální protilátka od firmy Ortho Pharmaceutical Corporation, Raritan, New Jersey, USA.

²Buňky lidské periferní krve byly izolovány popsanou metodou /Boyum, A.: Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. Scand. J. Immunol. 5, Suppl. 5:9, 1976/ na Verografin-Ficoll gradientu.

³Byl použit postup podle práce Lansdorp, P.M., Astaldi, G.C.B., Oosterhof, F., Janssen, M.C., Zeijlemaker, W.P.: Immunoperoxidase procedures to detect monoclonal antibodies against cell

surface antigen. Quantitation of binding and staining of individual cells. J. Immunol. Meth. 39: 393-405, 1980.

⁴T lymfocyty byly izolovány průchodem směsi lymfocytů sloupečkem nylonové vaty popsanou metodou /Julius, M.H., Simpson, E., Herzenberg, L.A.: A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. Eur. J. Immunol. 3: 645-649, 1971/.

⁵B lymfocyty byly izolovány adsorbci na plastické desky pokryté protilátkou proti lidskému imunoglobulinu popsanou metodou /Mage, M.G., McHugh, L.L., Rothstein, T.L.: Mouse lymphocytes with and without surface immunoglobulin: preparative scale separation in polystyrene tissue culture dishes coated with specifically purified anti-immunoglobulin. J. Immunol. Meth. 15: 47-56, 1977/.

K průkazu, že protilátka MEM-57 rozpoznává antigen T3 na povrchu T lymfocytů, bylo použito tří přístupů:

- a/ Monoklonální protilátka MEM-57 precipitovala z povrchově jodovaných ¹²⁵INa buněk /Morrison, M.: Lactoperoxidase-catalyzed iodination as a tool for investigation of proteins. Methods Enzymol. 70:214-220, 1980/ /T linie HPB-AL/ antigenní frakci o mol. hmotnosti 23 kDa, prokázanou pomocí elektroforetické analýzy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecyl sulfátu sodného; mol. hmotnost této antigenní frakce odpovídá mol. hmotnosti T3 antigenu.
- b/ Protilátka MEM-57 v koncentraci 10-20 ng/ml měla mitogenní vlastnosti prokázané indukcí DNA syntézy /pomocí inkorporace ³H thymidinu/ v lidských lymfocytech periferní krve. U protilátky OKT3 byly popsány shodné mitogenní účinky /Van Wauwe, J.P., DeMey, J.R., Goossens, J.G.: OKT3: A monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties. J. Immunol. 124:2708-2713, 1980/.
- c/ Identita antigenů rozpoznávaných protilátkami MEM-57 a OKT3 byla prokázána tak, že antigen reagující s protilátkou MEM-57 byl nejprve přemístěn k jednomu pólu T buněk, tzv. vytvoření čepiček /"capping"/ s následným pohlcením antigenu do nitra většiny buněk a pak byla testována reaktivita takto pozměněných buněk s protilátkou OKT3. Bylo zjištěno,

že po odstranění antigenu T3 /protilátkou MEM-57/ vymizí také schopnost T lymfocytů vázat protilátku OKT3, zatímco reaktivita s protilátkou nepříbuzné specifčnosti B2M-01 /Hilgert, I., Hořejší, V., Křištofová, H.: The use of murine monoclonal antibody B2M-01 for detection and purification of human γ_2 -microglobulin. *Fol. biol.* /Praha/ 30:369-376, 1984/ se nezmění. Tento test byl prováděn tak, že T lymfocyty byly inkubovány 30 min při 20 °C v roztoku protilátky MEM-57 a poté 30 min při 37 °C s prasečí protilátkou proti myšímu imunoglobulinu. S takto připravenými buňkami byl proveden běžný nepřímý imunofluorescenční test, tj. inkubace s protilátkami MEM-57, OKT3, B2M-01 a ve druhém kroku s prasečím antimyším imunoglobulinem značeným fluoresceinisothiokyanatem. T lymfocyty byly před inkubací s následující protilátkou promyty vždy fyziologickým roztokem.

Buňky hybridomu MEM-57 mají ultrastrukturní obraz typických myelomových buněk. In vitro rostou jako polosuspensní kultury. Základním kultivačním médiem je Eaglovo minimální esenciální médium s Hanksovou solnou směsí doplněné o neesenciální aminokyseliny, L-glutamin /3mM/, pyruvát sodný /1mM/. Toto médium /označované jako RPMI, Ústav molekulární genetiky ČSAV/ je pro kultivaci hybridomu MEM-57 doplněno penicilinem, streptomycinem, gentamycinem, 2-merkaptetanolem /0,05 mM/, pufrům HEPES /10 mM/ a inaktivovaným bovinním sérem /Bioveta, Ivanovice na Hané, 10 %/. Hybridom je kultivován při 37 °C. Střední generační čas je 18 hod. a 5 měsíců po sestrojení byl modální počet chromosomů 88. Produkovaná protilátka je monoklonální imunoglobulin podtřídy IgG2a s lehkými řetězci typu kapa, její isoelektrický bod je pH 7.4 - 8.0.

Monoklonální protilátka produkovaná hybridomem MEM-57 reaguje specificky s lidskými T buňkami. Hybridom MEM-57 může být průmyslově využíván jako zdroj monoklonální protilátky proti T buňkám v analytických metodách. Monoklonální protilátka hybridomu MEM-57 může být využita pro stanovení T buněk v periferní krvi a lymfatických orgánech při klinické diagnostice v zdravotnických zařízeních, zvláště při různých imuno-

logických nedostatečnostech a autoimunních onemocněních a pro klasifikaci leukémií T buněčného původu. Monoklonální protilátka může být využita také v terapii jako imunosupresivum při odhojovacích krizích v klinické transplantaci nebo ke specifickému odstraňování T lymfocytů při transplantaci kostní dřeně.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS MEM-57 produkující monoklonální protilátku podtřídy IgG2a proti membránovému antigenu T3 lidských T buněk.