



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

253336

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 15/00

(22) Přihlášeno 15 05 86

(21) PV 3522-86

(40) Zveřejněno 12 03 87

(45) Vydáno 15 06 88

(75)

Autor vynálezu

BERESTEN SERGEJ RNDr. CSc., MOSKVA, VIKLICKÝ VLADIMÍR MUDr. CSc.,
PRAHA, FROLOVÁ LUDMILA RNDr. CSc., MOSKVA, MACKŮ BLANKA PhDr., PRAHA,
TRÁVNÍČEK MILOSLAV ing. CSc., PRAHA, KISELEV LEV RNDr. DrSc., MOSKVA,
ŘÍMAN JOSEF akademik, PRAHA

(54) Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS RT-12

Řešení se týká myšího lymfocytárního hybridomu produkujícího protilátku proti reverzní transkriptáze, uloženého ve Sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV pod označením RT-12. Monoklonální protilátka hybridomu RT-12 je vhodná pro použití v metodách enzymoimunologických, radioimunologických a preparativních.

Vynález se týká nového hybridomu, tj. hybridního jednobuněčného organismu, sestrojeného fúzí buňky myší myelomové linie Sp 2/O-Ag 14 a myší slezinné lymfoidní buňky, produkující protilátku proti reverzní transkriptáze.

Doposud se protilátky proti reverzní transkriptáze připravují tak, že je reverzní transkriptáza opakovaně injikována jako antigen pokusným zvířatům, nejčastěji králíkům. Sérum takto imunizovaných zvířat, odebírané po určité době po podání antigenu, slouží jako zdroj protilátek, užívaných především pro kvalitativní stanovení reverzní transkriptázy a k izolaci vysoce čistých preparátů tohoto enzymu. Tento postup, nazývaný konvenční imunizací, má několik nevýhod. V séru imunizovaných zvířat se nachází heterogenní směs protilátek, jejich 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 reverzní transkriptáze, uložený ve Sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV v Praze 4, Vídeňská ul. 1083, pod označením IMG CZAS RT-12.

Uvedený hybridom byl získán způsobem známým 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, vzniklých fúzí buněk myší myelomové linie Sp 2/D-Ag 14 a buněk, získaných ze sleziny myší kmene 810.A imunizovaných reverzní transkriptázou izolovanou z viru ptačí myeloblastózy (AMV) o 50% čistotě.

Výhodou hybridomu je, že produkuje homogenní protilátku, tzv. protilátku monoklonální, která je schopna specificky reagovat s oběma podjednotkami reverzní transkriptázy, jak bylo zjištěno po přenosu virových proteinů (separovaných na elektroforéze za redukcí podmínek) na nitrocelulózovou membránu a po specifické detekci nepřímým imunologickým testem (s využitím protilátky RT-12 a prasečí protilátky proti myším imunoglobulinům konjugované s peroxidázou; ÚSOL, Praha). V dalších pokusech nebyl prokázán blokovací efekt protilátky na enzymatickou aktivitu izolované reverzní transkriptázy.

Hybridom RT-12 je možno kultivovat in vitro v médiích vhodných pro živočišné buňky a je adaptován pro růst in vivo v peritoneální dutině myší hybridů F_1 (B10.A + BALB/c). Z konzerv hybridomových buněk uchovávaných v kapalném dusíku je možné zahájit produkci protilátky bez dalšího antigenu.

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 10 dní před převodem buněk hybridomu ovlivněna parafinovým olejem (0,5 ml intraperitoneálně). Po 12 dnech růstu hybridomu v peritoneální dutině byla myš zabita a naprodukováná ascitická tekutina odebrána. Celkem bylo získáno 3,0 ascitické tekutiny, která obsahovala 5 mg/ml imunoglobulinu. Monoklonální protilátka reagovala se specifickým antigenem v enzymoimunologickém testu (při použití prasečí antimyší protilátky značené křenovou peroxidázou) až do ředění $1:10^6$.

Buňky hybridomu RT-12 mají ultrastrukturální obraz typických myelomových buněk, kde převážující 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 doplněné o neesenciální aminokyseliny, L-glutamin (3 mM), pyruvát sodný (1 mM). Toto médium (označené jako H-MEMd, Ústav molekulární genetiky ČSAV), je pro kultivaci hybridomu RT-12 doplněno penicilinem, streptomycinem, gentamycinem, 2-merkaptoestano-lem (0,05 nM), puforem HEPES (10 nM) a inaktivovaným bovinním sérem (Bioveta, Ivanovice na Hané, 10%). Hybridom je kultivován při 37 °C. Střední generační čas je 16,4 hod. a 13 měsíců po sestrojení byl modální počet chromosomů 79. Produkováná protilátka je monoklonální imunoglobulin podtřídy IgG 2b s lehkými řetězci typu kappa, její izoelektrický bod je pH 7,1-7,3.

Monoklonální protilátka, produkovaná hybridomem RT-12 reaguje specificky s reverzní transkriptázou.

Hybridom RT-12 může být průmyslově využíván jako zdroj monoklonální protilátky proti reverzní transkriptáze v metodách analytických nebo preparativních.

P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS RT-12 produkující monoklonální protilátku podtřídy IgG 2b proti reverzní transkriptáze ptačí myoblastozy.