



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

248383

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 15/00

/22/ Přihlášeno 06 06 85
/21/ PV 4065-85

(40) Zveřejněno 16 01 86

(45) Vydáno 16 11 87

(75)

Autor vynálezu

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

(54) Myši lymfocytární hybridom IMG CZAS MEM-09

Řešení se týká myšního lymfocytárního hybridomu, produkujícího protilátku proti lehkému řetězci typu kappa lidských imunoglobulinů, uloženého ve sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV pod označením MEM-09. Monoklonální protilátka hybridomu MEM-09 je vhodná pro použití v radioimunologické, nepřímé enzymoimunologické a imunofluorescenční analýze a pro čištění afinitní chromatografií lidských imunoglobulinů obsahujících lehké řetězce typu kappa.

Vynález se týká nového hybridomu, tj. hybridního jednobuněčného organismu, sestrojeného fúzí buněk myší myelomové linie Sp2/O-Ag14 a myší slezinne lymfoidní buňky, produkující protilátku proti kappa lehkým řetězcům lidských imunoglobulinů.

Doposud se protilátky proti lehkým řetězcům imunoglobulinů vyrábějí tak, že kappa řetězce imunoglobulinu jsou opakovaně injikovány jako antigen pokusným zvířatům. Sérum takto imunizovaných zvířat, odebírané po určité době působení antigenu, slouží jako zdroj protilátek, užívaných zejména pro kvantitativní stanovení kappa řetězců imunoglobulinu v séru nebo na lymfoidních nebo leukemických buňkách metodou radioimunologické analýzy nebo nepřímé imuno-fluorescenční analýzy.

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 zadanému antigenu i protilátky proti nečistotám antigenního preparátu.

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 kappa řetězcům lidského imunoglobulinu, uložený ve Sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV v Praze 4, Vídeňská č. 1083, pod označením IMG CZAS MEM-09.

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 Sp2/O-Ag14 a buněk, získaných ze sleziny myší kmene BALB/c imunizovaných lidským imunoglobulinem.

Výhodou hybridomu je, že produkuje homogenní protilátku, tzv. protilátku monoklonální, která je schopna specificky reagovat s kappa lehkými řetězci lidských imunoglobulinů. Hybridom MEM-09 je možné kultivovat in vitro v médiích vhodných pro živočišné buňky a je adaptován pro růst in vivo v peritoneální dutině myší kmene BALB/c.

Z konzerv uchovávaných v kapalném dusíku je možné zahájit produkci protilátky bez dalšího antigenu. Protilátka produkovaná hybridomem MEM-09 reaguje specificky jak s lidským imunoglobulinem, tak s populacemi lidských B buněk nesoucích jako složku buněčné membrány kappa řetězce imunoglobulinové molekuly a není třeba se zbavovat protilátek balastních.

P ř í k l a d 1

Za účelem pomnožení hybridomových buněk in vivo bylo aplikováno 5×10^6 buněk do peritoneální dutiny myší. Aby došlo k lepšímu uchycení aplikovaných buněk byla myš 10 dní před přenosem buněk hybridomu ovlivněna parafinovým olejem /0,5 ml intraperitoneálně/. Po 14 dnech růstu hybridomu v peritoneální dutině byla myš zabita a naprodukováná ascitická tekutina odebrána.

Celkem bylo získáno 1,5 ml ascitické tekutiny, která obsahovala 10 mg/ml imunoglobulinu. Protilátka reagovala se specifickým antigenem /lidským imunoglobulinem/ v enzymoimunologickém testu /při použití prasečí antimyší protilátky značené křenovou peroxidázou/ až do ředění $1:10^5$.

Monoklonální protilátka reagovala specificky v nepřímém imunofluorescenčním nebo enzymoimunologickém testu s částí lymfocytů periferní krve. Oběma metodami bylo zjištěno 15 až 20 % pozitivních buněk v enzymoimunologickém testu až do řešení ascitické plazmy $1:10^4$ a v testu nepřímé fluorescence až do ředění $1:10^2$. Při použití čištěných populací T a B lymfocytů byla zjištěna reaktivita protilátky MEM-09 s 50 až 60 % B lymfocytů a 1 % T lymfocytů. Negativní byly monocyty, granulocyty a erytrocyty.

Příklad 2

Ze 2 ml ascitické tekutiny obsahující protilátku MEM-09 byla připravena globulinová frakce precipitací síranem amonným a navázána na 2 ml CNBr-aktivované Sepharosy 4B. Na 1 ml kolonku připravenou z tohoto imunosorbentu bylo naneseno 0,5 ml lidského séra a po promytí 10 ml fyziologického roztoku byl specificky adsorbovaný antigen vymyt celkem 2,5 ml 0,1 M glycin-HCl pufru pH 2,2 a eluát byl ihned neutralizován 1 M fosfátovým pufrem pH 7,2.

Celkový výtěžek byl 4 mg imunoglobulinu, jehož identita a čistota byla prokázána elektroforetickými metodami. Preparát obsahoval převážně IgG a poskytoval v dvojité imunodifuzi v agarosovém gelu precipitační linii s králičím antisérem proti lidským kappa řetězcům, ale nikoli s antisérem proti lambda řetězcům /Sevac, Praha/.

Po 3x opakovaném nanesení původního vzorku séra na regenerovanou kolonku imunosorbentu /regenerace provedena prostým převedením do neutrálního fyziologického roztoku až se z imunosorbentu již žádný antigen nevymýval/ jsme získali nenavázanou část séra, která již neposkytovala precipitační linii s antisérem proti kappa řetězcům, ale precipitovala s antisérem proti lambda řetězcům.

Po SDS PAGE lidského séra nebo antigenu izolovaného afinitní chromatografií na imobilizované protilátce MEM-09 a převedení separovaných komponent na nitrocelulózu se enzymoimunologicky barvila výrazně komponenta o relativní molekulové hmotnosti 26 000. Všechny tyto výsledky souhlasí se závěrem, že protilátka MEM-09 reaguje s determinantou na lehkých řetězcích imunoglobulinů typu kappa.

Buňky hybridomu MEM-09 mají ultrastrukturní obraz typických myelomových buněk. Cytoplazma obsahuje velké množství polyribosomů, mitochondrie a slabě vyvinuté endoplasmatické retikulum. 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 /označované jako H-MEMd, Ústav molekulární genetiky ČSAV/ je pro kultivaci hybridomu MEM-09 doplněno penicilinem, streptomycinem, gentamycinem, 2-merkaptioetanolom /0,05 mM/, pufrem HEPES /10 mM/ a inaktivovaným bovinním sérem /Bioveta, Ivanovice na Hané, 10 %/.

Hybridom je kultivován při 37 °C. Střední generační čas je 17,2 hod. a 10 měsíců po sestrojení byl modální počet chromosomů 94. Produkováná protilátka je monoklonální imunoglobulin podtřídy IgG1 s lehkými řetězci typu kappa, její isoelektrický bod je pH 5,8 až 6,3.

Monoklonální protilátka produkovaná hybridomem MEM-09 reaguje specificky s kappa lehkými řetězci lidských imunoglobulinů.

Hybridom MEM-09 může být průmyslově využíván jako zdroj monoklonální protilátky proti lehkým řetězcům typu kappa lidských imunoglobulinů v metodách analytických anebo preparativních.

Monoklonální protilátka hybridomu MEM-09 může být využita pro analytické stanovení lidských imunoglobulinů s lehkým řetězcem typu kappa /v séru nebo jiných tělních tekutinách/

nebo ke kvantitativnímu stanovení subpopulace B lymfocytů nebo typu leukemických buněk neseoucích lehké řetězce kappa typu imunoglobulinů při klinické diagnostice ve zdravotnických zařízeních, zvláště při poruchách imunologického systému a nádorových onemocněních.

Imobilizované monoklonální protilátky může být použito k čištění kappa řetězce lidských imunoglobulinů pomocí afinitní chromatografie.

P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS MEM-09 produkující monoklonální protilátku podtřídy IgG1 proti kappa řetězcům lidských imunoglobulinů.