

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

264 752

(11) (B1)

(13)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 5/00//
G 01 N 33/53

(22) Přihlášeno 06 09 84

(21) PV 6689-84

(40) Zveřejněno 15 12 88

(45) Vydáno 15 12 89

(75)

Autor vynálezu

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

(54) Myší lymfocytární hybridom IMG CZASMEM-31

(57) Myší lymfocytární hybridom, produkující protilátku proti membránovému antigenu lidských supresorových a cytotoxických T buněk, uložený ve sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV pod označením MEM-31. Samotná monoklonální protilátka hybridomu MEM-31 je vhodná pro použití v enzymoimunologické a imunofluorescenční analýze lidských supresorových a cytotoxických T buněk.

Vynález se týká nového hybridomu, tj. hybridního jednobuněčného organismu, sestrojeného fúzí buňky myši myelomové linie Sp2/0-Ag14 a myši slezinné lymfoidní buňky, produkující protilátku proti membránovému antigenu přítomnému na lidských supresorových a cytotoxických T buňkách. Funkční studie ukázaly, že supresorové a cytotoxické T buňky mají společný membránový antigen a tvoří podtřidu lymfocytů s důležitými regulačními funkcemi, jejichž zastoupení v periferní krvi a lymfoidních tkáních se při imunodeficiencích liší od fyziologické normy.

Doposud se protilátky proti membránovým antigenům vyrábějí tak, že buněčné suspenze nebo membránové frakce jsou opakovaně injikovány produkčním zvířatům, nejčastěji králíkům. Sérum takto imunizovaných zvířat, odebírané po určité době působení antigenu, slouží jako zdroj protilátek. Takto jsou například připravovány protilátky proti thymocytům, které jsou používány k imunosupresi při transplantaci orgánů v klinické medicíně. Tento postup, nazývaný konvenční imunizací, 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.

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 podtřidu lymfocytů.

Podle publikovaného výsledku (Thomas, Y., Sosman, J., Irigoyen, O., Friedman, S. M., Kung, P. C., Goldstein, G., Chess, L.: Functional analysis of human T cell subsets defined by monoclonal antibodies. I. Collaborative T-T interactions in the immunoregulation of B cell differentiation. *J. Immunol.*, 125:2 401 až 2 408, 1980) se dá soudit, že lze připravit monoklonální protilátku specificky detegující podtřidu supresorových/cytotoxických lidských T buněk vhodnou pro diagnostické použití.

Podstatného pokroku v diagnostice lidských lymfocytů, projevujícího se vyšší spolehlivostí analytického výsledku, se dosáhne, je-li k dispozici hybridom, produkující monoklonální protilátku proti antigenu přítomnému na lidských supresorových/cytotoxických T buňkách, uložený ve Sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV v Praze 4, Vídeňská č. 1 083, pod označením IMG CZAS MEM-31.

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 až 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 supresorovými/cytotoxickými T buňkami. Hybridom MEM-31 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-31, reaguje specificky s populacemi lidských supresorových/cytotoxických T buněk a není třeba se zbavovat protilátek balastních.

P ř í k l a d

Za účelem pomnožení hybridomových buněk in vivo bylo aplikováno 4×10^6 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 9 dnech růstu hybridomu v peritoneální dutině byla myš zahubena a naprodukováná ascitická tekutina odebrána.

Celkem bylo získáno 3,5 ml ascitické tekutiny, která obsahovala 5 mg/ml imunoglobulinu. Monoklonální protilátka reagovala specificky v nepřímém imunofluorescenčním nebo enzymoimunologickém testu se supresorovými/cytotoxickými T buňkami periferní krve. Oběma metodami bylo zjištěno 25 až 35 % pozitivních buněk v enzymoimunologickém testu až do ředění ascitické plasmy 1:10⁴ a v testu nepřímé imunofluorescence až do ředění 1:10³. Specifická MEM-31 je identická s komerční monoklonální protilátkou OKT-8, jak bylo prokázáno opakovanými paralelními stanoveními včetně použití směsí dvou protilátek (viz tabulka).

T a b u l k a

Reaktivita protilátek produkovaných hybridomem MEM-31 a OKT8¹ s buňkami periferní krve

Buňky periferní lidské krve ²	% pozitivních buněk reagujících s monoklonální protilátkou v imunofluorescenčním testu ³		
	MEM-31	OKT8	MEM-31 + OKT8
lymfocyty	23 až 33	25 až 34	25 až 35
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 nad macrophages. Scand. J. Immunol. 5, Suppl. 5:9, 1976) na Verografin-Ficoll gradientu.

³Byla použita nepřímá imunofluorescenční technika s využitím prasečí antimyší protilátky značené fluoresceinisothiokyanatem.

Buňky hybridomu MEM-31 mají ultrastrukturní obraz typických myelomových buněk. Cytoplasma obsahuje velké množství polyribosomů, mitochondrie a slabě vyvinuté endoplasmatické retikulum. In vitro rostou jako polosuspensní kultury. Základním kultivačním médiem je Eaglovo minimální esenciální médium s Hankovou solnou směsí doplněné o neesenciální aminokyseliny, L-glutamin (3 mM), pyruvát sodný (1 mM). Toto médium (označované jako H-MEMd) je pro kultivaci hybridomu MEM-31 doplněno penicilinem, streptomycinem, gentamycinem, 2-merkaptetanolem (0,05 mM), puforem HEPES (10 mM) a inaktivovaným bovinním sérem (10%). Hybridom je kultivován při 37 °C. Střední generační čas je 18,4 h a 5 měsíců po sestrojení byl modální počet chromosomů 89. Produkovaná protilátka je monoklonální imunoglobulin podtřídy IgG2a s lehkými řetězci typu kapa, její isoelektrický bod je pI 7,4 až 7,6.

Monoklonální protilátka produkovaná hybridomem MEM-31 reaguje specificky s lidskými supresorovými/cytotoxickými T buňkami. Hybridom MEM-31 může být průmyslově využíván jako zdroj monoklonální protilátky proti supresorovým/cytotoxickým T buňkám v analytických metodách. Monoklonální protilátka hybridomu MEM-31 může být využita pro stanovení supresorových/cytotoxických T buněk v periferní krvi a lymfatických orgánech při klinické diagnostice v zdravotnických zařízeních, zvláště při sledování odhojovacích krizí po transplantaci orgánů, při různých imunologických nedostatečnostech a autoimunních onemocněních a pro klasifikaci leukémií T buněčného původu.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS MEM-31 produkuje monoklonální protilátku imunoglobulin podtřídy IgG2a proti membránovému antigenu lidských supresorových a cytotoxických T buněk.