

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

264 946

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 5/00

(21) PV 3398-88.I

(22) Přihlášeno 19 05 88

(40) Zveřejněno 15 12 88

(45) Vydáno 13 06 90

(75)
Autor vynálezu

VIKLIČKÝ VLADIMÍR MUDr. CSc., DRÁBER PAVEL RNDr. CSc., PRAHA,
LUKÁŠ ZDENĚK MUDr. CSc., BRNO, SLAVÍČKOVÁ ALENA RNDr. CSc.,
KUKLOVÁ EVA ing., PRAHA

(54)

**Myší lymfocytární hybridom NF-01 produkující protilátku
proti 210 kDa proteinu neurofilament**

(57) Řešení se týká myšího lymfocytárního hybridomu, produkujícího protilátku proti lidskému 210 kDa proteinu neurofilament, uloženého ve sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV v Praze pod označením IMG CZAS NF-01. Samotná monoklonální protilátka hybridomu NF-01 je vhodná pro použití v enzymoimunologické a radioimunologické analýze, testování tkání, buněk a tělních tekutin, jakož i pro vizualizaci 210 kDa proteinu neurofilament v buňkách na úrovni optického a elektronového mikroskopu a i imunohistochemického průkazu 210 kD a proteinu neurofilament na tkáňových řezech.

CS 264 946 B1

Vynález se týká myšího lymfocytárního hybridomu NF-01 produkujícího monoklonální protilátku proti 210 kDa proteinu neurofilament.

Doposud se protilátky obecně vyrábějí imunizací zvířat tak, že je antigen opakovaně aplikován zpravidla spolu s adjuvans pokusným zvířatům, nejčastěji králíkům, morčatům, prasatům či kozám. Sérum takto imunizovaných zvířat se odebírá po určité době působení antigenu a slouží jako zdroj protilátek, které se používají pro diagnostiku a léčbu řady onemocnění, ale i pro studium výskytu a funkce těchto antigenů v buněčné patofyziologii. 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, které je nutné ze sér odstraňovat složitým způsobem zvaným vysycování. V případě antisér proti proteinům neurofilament je situace komplikována jejich značnou vzájemnou podobností, takže připravit konvenční anti-sérum proti jedinému proteinu neurofilament vysycováním je pracné. Výrobní šarže konvenčních antisér se proto dají jen velmi nesnadno standardizovat a vycházejí z výroby v širokém rozmezí kvality. Pro výrobu každé šarže je třeba připravit značně čistý imunizační antigen a další antigeny pro vysycení balastních protilátek proti nečistotám či proti podobným molekulám, jako je např. vimentin, desmin nebo keratiny.

Tyto nedostatky jsou odstraněny použitím hybridomu produkujícího homogenní monoklonální protilátku proti 210 kDa proteinu neurofilament podle vynálezu.

Tento myší lymfocytární hybridom NF-01 byl získán způsobem známým z odborné literatury (Köhler G., Milstein C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature 256:495, 1975; Galfré G., Howe S. C., Milstein C., Butcher G. W., Howard J. C.: Antibodies to major histocompatibility antigen produced by hybrid cell lines, Nature 266:550, 1977; Fazekas de St. Groth S., Scheidigger D.: Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics, J. Immunol. Meth. 35:1 až 21, 1980) klonováním souboru hybridních buněk vzniklých fúzí buněk myší myelomové linie Sp 2/0 a buněk získaných ze sleziny myší kmene BALB/c, imunizovaných izolovaným cytoskeletálním preparátem získaným z prasečího mozku.

Výhodou myšího lymfocytárního hybridomu NF-01 je, že se váže na cílovou strukturu neurofilament, která je stabilní i při relativně drastické fixaci lidského materiálu formaldehydem a následném zalití do parafinu, což je rutinně používaná fixace histologického materiálu ve všech histopatologických laboratořích. Jiné v zahraničí známé protilátky např. protilátka proti proteinům neurofilament fy Labsystems, Helsinky, Finsko, reagují na obdobně připravených řezech až po enzymovém natrávení nebo vyžadují šetrnější speciální fixaci. Žádné z protilátek proti lidskému 210 kDa proteinu neurofilament produkovaných dosud popsanými hybridomy nemají schopnost reagovat na parafinových, nenatravených řezech. Protilátka NF-01 dává velmi dobré výsledky i na mražených tkáňových řezech. Tabulka č. 1 ukazuje sílu reakce protilátky NF-01 při použití různých způsobů zpracování tkáně:

T a b u l k a 1

Intenzita reakce protilátky NF-01 na tkáňových řezech fixovaných třemi různými způsoby (++) silná reakce, - nereaktivita).

Použitá fixace	metanol/aceton	metakarn	formaldehyd
Příprava tkáně	zmražené	parafinované	parafinované
Výsledná reakce	++	++	++

Výsledky ukazují, že tato protilátka může být využita na všech patologických odděleních pro rutinní diferenciální diagnostiku k odlišení nádorů pocházejících z neuronů.

Hybridom NF-01 je možné kultivovat in vitro v médiích vhodných pro pěstování živočišných buněk nebo v podmínkách in vivo v peritoneální dutině myši kmene BALB/c. Hybridom NF-01 je vhodný k dlouhodobému uchovávání v konzervách uložených v kapalném dusíku. Produkci monoklonální protilátky je možno zahájit po rozmrazení buněčné konzervy, aniž by bylo třeba dalšího antigenu. Monoklonální protilátka, produkováná hybridomem NF-01, reaguje s lidským 210 kDa proteinem neurofilament a nereaguje s žádným dalším proteinem středních filament ani s dalšími lidskými buněčnými bílkovinami, jak bylo zjištěno imunoblotingem, enzymo-imunologickým testem, nepřímou imunoperoxidázou a nepřímou imunofluorescenční metodou. Průkaz této specifčnosti byl získán po elektroforetickém přenosu rozsáhlého spektra buněčných a tkáňových lysátů a preparátů izolovaného cytoskeletu různých lidských tkání a buněčných linií, a to po separaci bílkovinných komponent v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného za redukujících podmínek. Po přenosu rozdělených bílkovin na nitrocelulózovou membránu byl 210 kDa protein neurofilament specificky vizualizován (detekován) s použitím NF-01 a následně prasečího antiséra proti myším imunoglobulinům konjugovaného s křenovou peroxidázou (ÚSOL, Praha). Jako pozitivní kontrola sloužila monoklonální protilátka proti proteinům neurofilament od firmy Labsystems, Helsinky, Finsko, která dávala obdobné výsledky.

Pomocí imunoperoxidázové reakce na tkáňových řezech lidských tkání, kterou potvrzovaly i výsledky dosažené při nepřímé imunofluorescenční metodě, byla u protilátky NF-01 zjištěna reaktivita na výběžcích gangliových buněk míšních a kůry mozečku.

V nepřímé imunofluorescenci využívající protilátky NF-01 a následné inkubace s prasečím antisérem proti myším imunoglobulinům označeným fluorescein-izo-thio-kyanátem nedocházelo u testovaných buněčných typů několika druhů k zobrazení intermediálních filament vimentinového, gliového i keratinového typu. Mikrotubuly ani mikrofilamenta odlišitelné svojí charakteristickou lokalizací a citlivostí ke kolcemidu a cytochalasinu B s protilátkou NF-01 nereagovaly.

Myší lymfocytární hybridom NF-01 je uložen ve sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV v Praze pod označením IMG CZAS NF-01.

P ř í k l a d

Za účelem pomnožení buněk hybridomu NF-01 v podmínkách in vivo bylo aplikováno 1×10^6 buněk do peritoneální dutiny myši. Aby došlo k lepšímu uchycení aplikovaných buněk, byla myš 14 dnů před přenosem buněk hybridomu ovlivněna parafinovým olejem (0,5 ml peritoneálně). Po 14 dnech růstu hybridomu v peritoneální dutině byla myš usmrcena a naprodukováná ascitická tekutina odebrána. Celkem bylo získáno 2,0 ml ascitické tekutiny, která obsahovala 3,0 mg/ml imunoglobulinu. Specifita získané protilátky byla testována na zmražených řezech lidského mozku, a to jak v nepřímé imunofluorescenci s využitím prasečí protilátky proti myšimu imunoglobulinu značené fluorescein-izo-thiokyanátem a imunoperoxidázovou reakcí s prasečí protilátkou proti myšimu Ig označenou křenovou peroxidázou (ÚSOL, Praha), tak i po elektroforetickém přenosu tkáňového lysátu připraveného z lidského mozku na nitrocelulózovou membránu s následnou detekcí nepřímým imunoperoxidázovým testem (viz výše). Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 2 a 3.

T a b u l k a 2

Reaktivita protilátky NF-01 s normálními lidskými tkáněmi (+ pozitivita, - negativita, V-vimentin, D-desmin, G-GFAP, N-proteiny neurofilament, K-keratiny).

Tkáň	Typ stř. filament	Reakce
Mozeček, neurony	N	+
Mozeček, astrocyty	G	-

T a b u l k a 2 pokračování

Tkáň	Typ stř. filament	Reakce
Mícha, neurony	N	+
Mícha, astrocyty	G	-
Ependymální buňky	V	-
Vazivo a cévy měkké pleny	V + D	-
Jazyk - epitel, žlázy	K	-
Jazyk - svalovina, cévy	D,V	-
Jazyk - vazivo	V	-
Jazyk - periferní nervy	N	+ ¹
Rectum - epitel	K	-
Rectum - svalovina, cévy	V,D	-
Rectum - vazivo	V	-
Rectum - periferní nervy	N	+ ¹
Pankreas - endokrinní parenchym	K	-
Pankreas - exokrinní parenchym	K	-
Pankreas - cévy, vazivo	V + D	-
Pankreas - periferní nervy	N	+ ¹
Trachea - epitel, žlázy	K	-
Trachea - cévy, vazivo	V + D	-
Trachea - chrupavka	V	-

pozn. 1 - zmražené řezy intenzivnější reakce

T a b u l k a 3

Reaktivita protilátky NF-01 s nádory lidského centrálního nervového systému (+ pozitivita, - negativita, K-keratin, V-vimentin, G-GFAP, N-proteiny neurofilament)

Nádor	Typ stř. filament	Reakce
Papilární ependymom	K,V	-
Meduloblastom	V,N	-
Astrocytom	G,V	-
Gangliogliom	G,N	+ ¹
Meingeom	V	-

¹ - v gangliové části

Z výsledků uvedených v tabulce č. 2 a 3 je zřejmé, že protilátka NF-01 reaguje výhradně s lidskými proteiny neurofilament. Úzká specificita protilátky byla potvrzena v imunoblotingu, kde byla nalezena silná reakce s 210 kDa proteinem přičemž ostatní testované cytoskeletální proteiny byly negativní (viz. tab. č. 4).

T a b u l k a 4

Reaktivita protilátky NF-01 s cytoskeletálními proteiny z lidského mozku (+ reaktivita, - negativita)

Cytoskeletální protein	Reakce v imunoblotingu
alfa-tubulin	-
beta-tubulin	-
vimentin	-

T a b u l k a 4 pokračování

Cytoskeletální protein	Reakce v imunoblotingu
proteiny neurofilament - 68 kDa	-
- 160 kDa	-
- 210 kDa	+
GFAP	-

Specifická získaná protilátka byla dále testována na panelu buněk z tkáňových kultur, a to jak v nepřímé imunofluorescenci s využitím prasečí protilátky proti myššímu imunoglobulinu značené fluorescein-izo-thiokyanátem, tak i po elektroforetickém přenosu buněčných lyzátů na nitrocelulózovou membránu s následnou detekcí nepřímým imunoperoxidázovým testem. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 5.

T a b u l k a 5

Reaktivita protilátky NF-01 s buňkami různých linií (V-vimentin, K-keratiny, N-proteiny neurofilament, IF-imunofluorescence, IB-imunobloting)

Druh	Tkáňový původ	Název	Typ interm. filament	Reakce IF IB	
člověk	plícní fibroblast	LED	V	-	-
	kaulatobuněčný karcinom	U1280	K + N	+	+
	epidermoidní karcinom	A 431	K	-	-
myš	fibroblast	3T3 Swiss	V	-	-
	neuroektoderm	C 1300	N	-	-
krysa	gliom	C6	G + V	-	-

Buňky hybridomu NF-01 mají morfologický obraz typických myelomových buněk. V podmínkách in vitro rostou v podobě polosuspenních kultur. Základním kultivačním médiem je RPMI doplněné L-glutaminem (3mM), penicilinem, streptomycinem, gentamycinem a inaktivovaným koňským sérem. Hybridom je kultivován při 37 °C, střední generační čas je 18,5 hodiny a modální počet chromosomů 7 měsíců po sestrojení hybridomu byl 79. Produkovaná protilátka je myší monoklonální imunoglobulin třídy IgM.

Monoklonální protilátka produkovaná hybridomem NF-01 reaguje specificky s lidským 210 kDa proteinem neurofilament na formaldehydem fixovaných histologických řezech zalitých parafinem a je tedy využitelná ve všech histopatologických laboratořích za použití různých testů imunohistochemických, enzymoimunologických, imunofluorescenčních, imunoblotingu. Kromě lékařské praxe je využitelná v oblasti teoretického výzkumu lidských intermediálních filament.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Myší lymfocytární hybridom IMG C2AD NF-01 produkující monoklonální protilátku třídy IgM proti lidskému 210 kDa proteinu neurofilament.