



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

233 896

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 02 06 83
(21) (PV 4006-83)

(51) Int. Cl.¹ C 12 N 15/00

(40) Zveřejněno 13 08 84
(45) Vydáno 01 04 87

(75)

Autor vynálezu

BUBENÍK JAN MUDr. DrSc.,
INDROVÁ MARIE RNDr. CSc.,
ŠÍMOVÁ JANA prom. biol., PRAHA

(54) Klonovaná linie leukemických buněk produkující interleukin 2

Vynález se týká klonované linie leukemických buněk produkujících interleukin 2. Linie EL-4 TF/K může být průmyslově využívána jako zdroj interleukinu 2 pro experimentální práci v imunologických, diferenciačních a dalších modelových systémech.

Vynález se týká klonované linie myších leukemických buněk EL-4 TF/K produkující interleukin 2 (T-buněčný růstový faktor).

Interleukin 2 se zatím připravoval jako supernatant kultur krysích slezinných buněk ovlivněných concanavalinem A. Po 24 hodinách kultivace slezinných buněk v tkáňové kultuře byl supernatant buněk stažen a sloužil jako zdroj interleukinu 2. Tento postup, nazývaný konvenční příprava interleukinu 2, má několik nevýhod. V supernatantu slezinných kultur ovlivněných concanavalinem A se nachází heterogenní směs mnoha lymfokinů, interleukinů a mediátorů, jejichž spektrum a titr jsou v každém jednotlivém supernatantu různé a neopakovatelné. Navíc interleukin 2 připravený tímto postupem má nízkou koncentraci, která kolísá za optimálních podmínek kolem 1j/ml média.

Uvedené nedostatky výše zmíněného a dosud užívaného postupu odpadnou, je-li k dispozici klonovaná linie leukemických buněk EL-4 TF/K, produkující monoklonální interleukin 2 a uložená ve Sbírce buněčných linií ÚMG ČSAV Praha 4, Vídeňská 1083 pod označením IMG CZAS EL-4 TF/K. Uvedená linie byla získána způsobem známým z odborné literatury (Farrar J. et al.: Thymoma production of T cell growth factor (IL-2). J. Immunol. 125: 2555-2558, 1980). Bylo testováno větší množství různých leukemických linií na produkci interleukinu 2, a to jak na produkci konstitutivní, tak na produkci indukovanou lektiny, phorbol myristát acetátem a kombinacemi těchto látek. Ze všech testovaných linií pouze jediná, linie EL-4 TF, produkovala po kombinované stimulaci concanavalinem A a phorbol myristát acetátem interleukin 2. Tato linie byla dále opakovaně klonována a z přibližně 200 klonů byl vybrán klon s nejvyšší produkcí interleukinu 2, označený jako EL-4 TF/K.

Výhodou klonované linie je, že po stimulaci phorbol myristát acetátem produkuje homogenní buněčný produkt, interleukin 2, který má imunoregulační účinek a který může sloužit v organismu k posílení imunitní reakce. Klonovanou buněčnou linii EL-4 TF/K je možno kultivovat in vitro v médiích vhodných pro živočišné buňky a je adaptována pro růst in vivo u myšího kmeně C 57 BL/10. Z konzerv uchovávaných v kapalném dusíku je možné zahájit produkci interleukinu 2 po přidání phorbol myristát acetátu a concanavalinu A. Interleukin 2 produkovaný klonovanou vysokoprodukční linií EL-4 TF/K specificky stimuluje syntézu DNK savčích (myších, krysích) T-lymfocytů in vitro a v organismu amplifikuje imunitní odpověď zprostředkovanou těmito lymfocyty. Monoklonální produkt má koncentraci 5-80 jednotek/ml a není zde třeba se zbavovat balastních mediátorů, lymfokinů a interleukinů.

Příklad

Buňky linie EL-4 TF/K byly 24 hodin pěstovány ve tkáňové kultuře obsahující 20 ng/ml phorbol myristát acetátu a 2 μ g concanavalinu A a to v koncentraci 2×10^8 buněk/200 ml média. Po skončení kultivace bylo kultivační médium zbaveno buněk a zfiltrováno. Celkem bylo získáno 200 ml kultivačního média, které obsahovalo 12 jednotek interleukinu 2/ml, tj. 240 jednotek interleukinu 2. Toto množství odpovídá konvenčnímu interleukinu 2, který lze získat ze slezin 30 krys při použití 2400 ml téhož kultivačního média. Interleukin 2 reagoval s buněčnou linií imunních lymfocytů CTLL (Gillis S. and Smith K.A.: Long-term culture of tumour-specific cytotoxic T-cells. Nature (London) 268:154-156, 1977), která specificky odpovídá DNK syntézou pouze na interleukin 2. DNK syntézu lze kvantitativně stanovit inkorporací ^3H - TDR; tato inkorporace je přímo úměrná koncentraci interleukinu 2. Linií CTLL stejně jako jiné linie imunních lymfocytů lze v interleukinu 2 neomezeně množit, zatímco bez interleukinu 2 takové buňky do 24 hodin hynou. Imunní lymfocyty namnožené v tkáňové kultuře lze pak použít pro injekci do organismu, který takové imunní buňky postrádá a posílit tak imunitní odpověď proti antigenu.

Buňky klonované linie EL-4 TF/K rostou jako suspenzní či polosuspenzní kultury. Základním kultivačním médiem je Eaglovo minimální esenciální médium s Hanksovou solnou směsí doplněné o neesenciální aminokyseliny, L-glutamin (3mM) a pyruvát sodný (1mM). Toto médium (označované jako H-MEMd, Ústav molekulární genetiky ČSAV), je pro kultivaci buněčné linie doplněno penicilinem, streptomycinem a inaktivovaným bovinním sérem (Bioveta, Ivanovice na Hané, 10%). Kultivace probíhá při 37 °C. Modální počet chromosomů EL-4 TF/K buněk je v hypodiploidní oblasti (39). Pro klonální původ EL-4 TF/K populace jednoznačně svědčí, že 39 ± 1 chromosom obsahuje 88% buněk populace. Interleukin 2 produkovaný linií EL-4 TF/K reaguje specificky s myšími a krysími lymfocyty.

Linie EL-4 TF/K může být průmyslově využívána jako zdroj interleukinu 2 pro experimentální práci v imunologických, diferenciačních a dalších modelových systémech.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

233 898

Klonovaná linie leukemických buněk produkující interleukin 2, uložená ve Sbírce buněčných linií Ústavu molekulární genetiky ČSAV, pod označením IMG CZAS EL-4 TF/K.