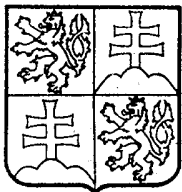


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATÍVNA
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNY ÚRAD
PRE VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

270 544

(21) PV 9004-88.R
(22) Prihlásené 29 12 88

(40) Zverejnené 14 11 89
(45) Vydané 25 06 91

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 15/00

(75) Autor vynálezu

VAREČKOVÁ EVA RNDr. CSc.,
SOLÁRIKOVÁ ĽUDMILA PhMr., BRATISLAVA,
RAGAČ PAVOL RNDr. CSc., PREŠOV,
MIKLOŠOVÁ MARTA RNDr., ŠARIŠSKÉ MICHAĽANY

(54)

Myši lymfocytárny hybridóm VU IIH3

(57) Riešenie sa týka myšieho lymfocytárneho hybridómu, produkujúceho protilátku podtriedy IgG 1 proti nukleoproteínu vírusu chrípky A. Hybridóm je uložený v zbierke hybridómov Virologického ústavu SAV v Bratislave pod označením VU IIH3.

Vynález sa týka myšieho lymfocytárneho hybridómu, tj. hybridného jednobunkového organizmu, zostrojeného bunkovou fúziou myšej myelómovej línie Sp2/O a myšej slezinovej bunky, produkujúceho protilátku proti vírusu chrípky A.

Protilátky voči proteínom vírusu chrípky sa doteraz pripravujú tak, že vírus resp. jeho izolované proteíny sa opakovane injikujú ako antigén pokusným zvieratám, najčastejšie králikom, myšiam, alebo fretkám. Sérum takto imunizovaných zvierat, odobraté po určitej dobe pôsobenia antigénu, slúži ako zdroj protilátok, používaných predovšetkým pre kvantitatívnu alebo kvalitatívnu analýzu antigénu - vírusu chrípky - vo výskume a v imunodiagnostickej praxi.

Tento postup, nazývaný konvenčnou imunizáciou, má niekoľko nevýhod. V sére imunizovaných zvierat sa nachádza heterogénna zmes protilátok, ktorých spektrum je v každom jednotlivom organizme rôzne a neopakovateľné. Organizmus spravidla vytvorí okrem protilátok voči žiadanému antigénu i protilátky voči nečistotám antigénového preparátu, ktoré je potrebné zo sér odstraňovať vysycovaním. Výrobné šarže konvenčných sér sa preto dajú ťažko štandardizovať a bývajú v širokom rozmedzí kvality. Pre výrobu každej šarže treba pripraviť čistý imunizačný antigén a ďalšie antigény na vysýtenie balastných protilátok proti nečistotám.

Uvedené nedostatky vyššie zmieneného a dosiaľ používaného postupu odpadnú, ak je k dispozícii hybridóm, produkujúci monoklonálnu protilátku proti nukleoproteínu vírusu chrípky A, uložený v zbierke hybridómov Virologického ústavu SAV v Bratislave, Mlynská dolina 1, pod označením VU IIH3.

Uvedený hybridóm bol získaný spôsobom známym z odbornej literatúry (Köhler, G., Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* 256 (1975), 495; Gerhard, W.: Fusion of cells in suspension and outgrowth of hybrids in conditioned medium. In: Monoclonal antibodies. Hybrids: A New Dimension in Biological Analyses. R. H. Kennet, T. J. McKearn, K. B. Bechtol, eds., New York. Plenum Press (1980), 370.) klonovaním súboru hybridných buniek po fúzii myšej myelómovej línie Sp2/O a buniek, získaných zo sleziny myši kmeňa BALB/c, imunizovaných vírusom chrípky A/Dunedin/4/73 (H3N2).

Výhodou hybridómu podľa vynálezu je, že produkuje homogénnu protilátku, tzv. monoklonálnu protilátku, ktorá je schopná špecificky reagovať s nukleoproteínom chrípkového vírusu typu A. Hybridóm VU IIH3 možno kultivovať in vitro v médiach vhodných pre živočíšne bunky, alebo in vivo v peritoneálnej dutine myši kmeňa BALB/c. Z konzerv, uchovaných v kvapalnom dusíku, možno zahajiť produkciu protilátky bez ďalšej imunizácie antigénom.

Príklad

Pre účel pomnoženia hybridómových buniek in vivo sa aplikovalo 5×10^6 buniek do peritoneálnej dutiny myši. Pre lepšie uchytenie aplikovaných buniek bola myš 15 dní pred prenosom buniek hybridómu premedikovaná parafínovým olejom (0,5 ml intraperitoneálne). Po 20 dňoch rastu hybridómu v peritoneálnej dutine bola myš zabitá a vyprodukovaná ascitická tekutina odobratá. Celkom sa získalo 9 ml ascitickej tekutiny obsahujúcej 6 mg/ml imunoglobulínu. Ascitická tekutina, obsahujúca produkt hybridómu VU IIH3, vykazovala v radioimunoanalytickom teste špecifickú väzbu k vírusom chrípky typu A (napr. subtyp H1, H2, H3), ale nie voči typu B, a v radioimunoprecipitačnom teste sa viazala na nukleoproteín vírusu chrípky A.

In vitro rastú bunky hybridómu ako polosuspenná kultúra. Majú tvar (guľatý) a veľkosť charakteristickú pre myelómové bunky, obsahujú fúzovane bunkové jadrá, sú aneuploidné. Bunky hybridómu VU IIH3 majú ultraštruktúrny obraz typických myelómových buniek, kde prevažujúcou organelou sú voľné a na membrány viazané polyribosómy. Základným kultivačným médiom je Dulbeccova modifikácia Eaglovho minimálneho esenciálneho média (Dulbecco, R.

a Freeman, G., Virology 8 (1959), 396). Toto médium označované ako DMEM, je pre kultiváciu hybridómu doplnené gentamycínom a inaktivovaný prekolostrálnym sérom (10%, Bioveta, Ivanovice na Hané). Hybridóm je kultivovaný pri 37 °C - jeho stredná generačná doba je približne 24 h. Produkovaná protilátka je monoklonálny imunoglobulín podtriedy IgG 1.

Hybridóm VU IIH3 sa môže priemyselne využívať ako zdroj protilátky proti nukleoproteínu (nukleokapsidovému proteínu) vírusu chrípky A v metódach analytických, preparatívnych alebo diagnostických a to:

- 1) pri kvantitatívnom a kvalitatívnom vyhodnocovaní prítomnosti nukleoproteínu vírusu chrípky A vo vyšetrovanom materiáli (napr. klinické vzorky),
- 2) pri vyhodnocovaní epidemiologickej situácie,
- 3) pri purifikácii nukleoproteínu vírusu chrípky A,
- 4) ako zdroj protilátky jedinej podtriedy (IgG 1) pre prípravu sér špecifických pre uvedené podtriedy.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Myši lymfocytárny hybridóm VU IIH3, produkujúci monoklonálnu protilátku podtriedy IgG 1 proti nukleoproteínu vírusu chrípky A.