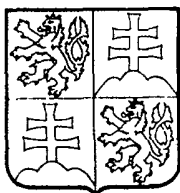


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATÍVNA
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNY ÚRAD
PRE VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENIU

270 538

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 15/00

(21) PV 8158-88.N

(22) Prihlášené 09 12 88

(40) Zverejnené 14 11 89

(45) Vydané 25 06 91

(75) Autor vynálezu

BYSTRICKÁ MAGDALÉNA ing. CSc.,
RUSS GUSTÁV RNDr. CSc., BRATISLAVA,
RAGAČ PAVOL MVDr. CSc., PREŠOV,
MIKLOŠOVÁ MARTA RNDr., ŠARIŠSKÉ MICHAĽANY

(54)

Myši lymfocytárny hybridóm VÚ 159/1-9

(57) Riešenie sa týka myšieho lymfocytárneho hybridómu, produkujúceho monoklonálnu protilátku proti glykoproteínu gB vírusu Herpes simplex typ 1 a typ 2, uloženého v zbierke hybridómov Virolofickej ústavu SAV v Bratislave pod označením VÚ 159/1-9. Monoklonálna protilátka produkovaná hybridómom VÚ 159/1-9 je vhodná na diagnostické účely v imunofluorescenčnom teste /IF/, v rádioimunoanalytickom teste /RIA/, imunoenzymatickej analýze /ELISA/ a v rádioimunoprecipitačnom teste, na stanovenie prítomnosti a množstva vírusového antigénu v testovanom materiáli. Je vhodná aj na imunoafinitnú purifikáciu glykoproteínu gB z extraktov infikovaných buniek.

Vynález sa týka hybridómu, t.j. hybridného jednobunkového organizmu, zostrojeného fúziou myšej myelómovej bunky Sp2/O a myšej slezinovej lymfoidnej bunky, produkujúcej protilátku voči glykoproteínu gB vírusu Herpes simplex typ 1 a typ 2.

Doposiaľ sa protilátky voči vírusu Herpes simplex pripravovali tak, že vírus purifikovaný alebo nepurifikovaný, resp. jeho izolované proteíny boli opakovaně injikované pokusným zvieratám, najčastejšie králikom, myšiam alebo morčatám. Sérum takto imunizovaných zvierat, odobrané po viacerých dávkach antigénu, slúžilo ako zdroj protilátok, používaných najmä pre kvalitatívny dôkaz antigénu - vírusu Herpes simplex - v základnom výkume a v imunodiagnostickej praxi (Kalimo K.O.K., Marttila R.J., Granfors K., Viljanen M.K.: Solid-phase radioimmunoassay of human immunoglobulin M and immunoglobulin G antibodies against Herpes simplex virus type 1 capsid, envelope and excreted antigens. Infect. Immun. 15/1972/, 883-889; Lesco J., Hana L., Matis J.: Reactions of immune sera against the nucleocapsid, envelope and whole Herpes simplex virus type 1. Acta virol. 20/1976/, 48-52). Tento postup nazývaný konvenčnou imunizáciou má niekoľko nevýhod. V sére imunizovaných zvierat sa nachádza heterogénna zmes protilátok, ktorých spektrum je v každom organizme iné a neopakovateľné. Organizmus vytvorí okrem protilátok voči žiadanému antigénu aj protilátky voči nečistotám bunkového pôvodu nachádzajúcim sa v antigéne. Tieto protilátky je potrebné zo séra odstraňovať vysycovaním. Výrobné šarže konvenčných antisér sa preto dajú ťažko štandardizovať a bývajú v širokom rozmedzí kvality. Pre výrobu kvalitnej šarže séra treba pripraviť čistý imunizačný antigén v dostatočnom množstve, čo je najmä u vírusu Herpes simplex postup náročný na materiál a technické vybavenie laboratória. V poslednom čase sa čoraz častejšie používajú na diagnostikovanie herpetických infekcií monoklonálne protilátky, tzv. typovospoločné, ktoré sú schopné reagovať s oboma typmi vírusu Herpes simplex.

Uvedené nevýhody doteraz používaných postupov sa nevyskytnú, ak je k dispozícii hybridómová bunková línia produkujúca typovospoločnú monoklonálnu protilátku voči glykoproteínu gB vírusu Herpes simplex typ 1 a typ 2, ktorá je uložená v zbierke hybridómov Virologického ústavu SAV, Mlynská dolina 1, Bratislava pod označením VÚ 159/1-9.

Uvedený hybridóm bol získaný spôsobom známym z odbornej literatúry (Kohler G., Milstein, G.: 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. Monoclonal antibodies: A new dimension in Biological analyses, Kennett R. H. a spol., eds. New York, Plenum Press (1980), 370.).

Hybridné bunky získane po fúzii myších myelómových Sp2/O buniek a buniek získaných zo sleziny myši BALB/c imunizovanej zmesou purifikovaných vírusov Herpes simplex typ 1 a typ 2, boli klonované a po otestovaní bol vybraný klon VÚ 159/1-9.

Výhodou hybridómu je, že produkuje homogénnu protilátku, tzv. monoklonálnu protilátku, ktorá je schopná špecificky reagovať s glykoproteínom gB vírusu Herpes simplex typ 1 a typ 2. Hybridóm VÚ 159/1-9 možno kultivovať in vitro v médiach vhodných pre živočíšne bunky alebo in vivo v peritoneálnej dutine myši kmeňa BALB/c. Z konzerv zmrazených buniek uchovaných v kvapalnom dusíku, možno začať produkciu protilátky bez ďalšej imunizácie zvieraťa antigénom.

Príklad

Za účelom získania väčšieho množstva monoklonálnej protilátky VÚ 159/1-9 kultiváciou hybridómových buniek in vivo, 5×10^6 buniek sa aplikovalo do peritoneálnej dutiny myši. Pre lepšie uchytenie buniek bola myš 15 dní pred aplikáciou buniek premedikovaná parafínovým olejom (0,5 ml intraperitoneálne na 1 myš). Po 10 dňoch rastu hybridómu v peritoneálnej dutine, bola myš zabitá a vyprodukovaná ascitická tekutina odobraná. Týmto postupom možno priemerne získať asi 7 ml ascitickej tekutiny obsahujúcej 8 mg/ml

protilátky. Ascilitická tekutina obsahujúca produkt hybridómu VÚ 159/1-9 vykazovala špecifickú väzbu k vírusu Herpes simplex typ 1 a typ 2 v rádioimunoanalytickom teste /RIA/ a v imunoenzymatickej analýze /ELISA/. Metódou rádioimunoprecipitácie a elektroforézy v polyakrylamidovom géli sa zistila väzba monoklonálnej protilátky na glykoprotein gB vírusu Herpes simplex typ 1 a typ 2.

Bunky hybridómu VÚ 159/1-9 rastu in vitro ako polosuspenzná kultúra. Majú guľatý tvar a veľkosť charakteristickú pre myelómove bunky. Obsahujú fúzované bunkové jadrá, sú aneuploidne. Bunky hybridómu VÚ 159/1-9 majú ultraštruktúrny obraz typických myelómových buniek, kde prevažujúcou organelou sú voľne a na membránu viazané polyribosómy. Základným kultivačným médiom je Dulbeccova modifikácia Eagleovho minimálneho esenciálneho média (Dulbecco, R., Freema, G., Virology 8/1959/.396). Toto médium, označované ako DMEM, je pre kultiváciu hybridómu doplnené gentamycínom a inaktivovaným prekolostrálnym telacím sérom (10%, Bioveta, Ivanovice na Hané). Hybridóm je kultivovaný pri 37 °C v atmosfére 5% CO₂. Jeho generačná doba je približne 24 h. Produkovaná protilátka je monoklonálny imunoglobulín podtriedy IgG1.

Hybridóm VÚ 159/1-9 môže byť využívaný ako zdroj protilátky voči glykoproteínu gB vírusu Herpes simplex typ 1 a typ 2, ktorá sa dá použiť na kvalitatívny dôkaz prítomnosti vírusu Herpes simplex typ 1 a typ 2 vo vyšetrovanom materiáli, na kvantitatívne stanovenie množstva infikujúceho vírusu resp. glykoproteínu gB, pri vyhodnocovaní epidemickej situácie, na purifikáciu glykoproteínu gB z extraktov infikovaných buniek pomocou imunoafinitnej chromatografie a ako zdroj protilátky jedinej podtriedy (IgG1) pre prípravu antisér špecifických pre uvedenú podtriadu.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Myši lymfocytárny hybridóm VÚ 159/1-9, produkujúci monoklonálnu protilátku podtriedy IgG1 voči glykoproteínu gB vírusu Herpes simplex typ 1 a typ 2.