

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

255642

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 5/00

(22) Přihlášeno 15 10 86

(21) PV 7431-86.M

(40) Zveřejněno 16 07 87

(45) Vydáno 15 12 88

(75)

Autor vynálezu

HLOŽÁNEK IVO MVDr. DrSc., KOREC EVŽEN RNDr., DOSTÁLOVÁ VLASTA prom. biol.,
STARÁ JANA, PRAHA

(54) **Myší lymfocytární hybridom produkující protilátky proti korovému
antigenu viru hepatitidy B**

Řešení se týká myšího lymfocytárního hybridomu, produkujícího protilátky proti korovému antigenu viru hepatitidy B, který je uložen ve Sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV pod označením IMG-CZAS HBc 18 E₁₁B₁₂. Protilátka je vhodná pro detekci korového antigenu, pro afinitní purifikaci korového antigenu a pro detekci protilátek proti korovému antigenu v lidských sérech.

Vynález se týká myšího lymfocytárního hybridomu produkujícího protilátky proti korovému antigenu viru hepatitidy B.

Hybridní buněčná linie byla sestrojena fúzí buněk myší myelomové linie SP2/0 a myších sleziných lymfocytárních buněk, produkujících protilátky proti korovému /dřeňovému/ antigenu viru hepatitidy B. Korový antigen je strukturální součástí virionu viru hepatitidy B. Pro výraz "korový antigen" je odbornou světovou veřejností běžně přijímáno označení "CORE HBcAg".

Stanovení hladiny protilátek proti korovému antigenu v lidských sérech má zásadní význam pro diagnostiku a monitorování hepatitidy B. Toto vyšetření zatím není možné v klinických podmínkách v ČSSR provádět, vzhledem k tomu, že není dostupná detekční souprava obsahující purifikovaný korový antigen a protilátky proti němu.

Tento nedostatek odstraňuje myší lymfocytární hybridom produkující protilátky proti korovému antigenu viru hepatitidy B podle vynálezu uložený ve Sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV, Praha 6, Flemingovo nám. 2, pod označením IMG-CZAS HBc 18 E₁₁B₁₂. Uvedené protilátky mohou být použity v enzymoimunologickém testu pro detekci korového antigenu, dále pro afinitní čištění korového antigenu, což umožňuje purifikovat vysoce čistý korový antigen z jater nemocných hepatitidou typu B.

Monoklonální protilátku je rovněž možné využít v modifikovaném enzymoimunologickém testu pro detekci protilátek proti korovému antigenu v lidských sérech. Podstatného pokroku v diagnostice a monitorování hepatitidy B se dosáhne, je-li k dispozici klonovaná hybridní linie, produkující protilátky proti korovému antigenu viru hepatitidy B.

Uvedený hybridom byl získán způsobem známým z odborné literatury (Köhler, G., Milstein, C., Nature 256: 495-497, 1975) klonováním populace hybridních buněk získaných hybridizací buněk ze sleziny myší BALB/c, které byly imunizovány korovým antigenem viru hepatitidy B a buněk myší myelomové linie SP2/0. Výhodou hybridomu HBc 18 E₁₁B₁₂ je, že produkuje protilátky specificky reagující s korovým antigenem viru hepatitidy B. Tuto monoklonální protilátku lze použít pro detekci korového antigenu, pro afinitní purifikaci korového antigenu a pro diagnostiku protilátek proti korovému antigenu v lidských sérech. Použití této protilátky umožňuje vyvinutí diagnostické soupravy pro detekci protilátek proti korovému antigenu dosahující optimálních parametrů.

Hybridom HBc 18 E₁₁B₁₂ je možno kultivovat in vitro v médiích vhodných pro živočišné buňky a je adaptován pro růst in vivo v peritoneální dutině myší kmene BALB/c. Z konzerv, které jsou uchovávány v kapalném dusíku je možné zahájit produkci protilátky.

P ř í k l a d

Za účelem pomnožení hybridomových buněk in vivo bylo aplikováno $1,5 \times 10^6$ hybridomových buněk do peritoneální dutiny myši kmene BALB/c. Této myši bylo 14 dní před podáním hybridomových buněk aplikováno 0,7 ml parafinového oleje do peritoneální dutiny. Po 12 dnech růstu hybridomu v peritoneální dutině byla myš usmrčena a naprodukováná ascitická tekutina byla odebrána. Celkem bylo získáno 5 ml ascitické tekutiny, ve které bylo obsaženo přibližně 5 mg/ml imunoglobulinu. Monoklonální protilátka reagovala specificky s korovým antigenem v enzymoimunologickém testu.

Z ascitické tekutiny byl pomocí síranové metody vypurifikován imunoglobulin. Jamky mikrotitrakčních destiček byly potahovány monoklonální protilátkou produkovanou klonem HBc 18 E₁₁B₁₂, v koncentraci 30 µg/ml. Pak byly přidány vzorky obsahující různé koncentrace korového antigenu viru hepatitidy B a nakonec byl přidán konjugát polyklonální protilátky proti korovému antigenu s křenovou peroxidázou a enzymoimunologický test byl dokončen standardním způsobem. Tento test umožnil detekci 10 ng korového antigenu/ml.

Základní kultivační médium pro buňky hybridomu HBC 18 E₁₁B₁₂ je Eaglovo minimální esenciální médium s Hankovou solnou směsí doplněné o neesenciální aminokyseliny. Toto médium (označované jako H-MEMd - Ústav molekulární genetiky ČSAV) je pro kultivaci hybridomů doplněno inaktivovaným telecím sérem (Bioveta, Ivanovice na Hané), penicilinem a streptomycinem. Hybridom je kultivován při 37 °C. Hybridom HBC 18 E₁₁B₁₂ produkuje protilátku podtřídy IgG3, izoelektrický bod je pH 9.

Monoklonální protilátka produkovaná klonem HBC 18 E₁₁B₁₂ reaguje specificky s korovým antigenem viru hepatitidy B. Tuto protilátku lze využít k detekci korového antigenu, k afinitní purifikaci korového antigenu a k detekci lidských protilátek proti korovému antigenu v enzymoimunologickém testu. Tento hybridom může být průmyslově využíván jako zdroj protilátky proti korovému antigenu v diagnostických soupravách.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Myší lymfocytární hybridom IMG-CZAS HBC 18 E₁₁B₁₂, produkující protilátky proti korovému antigenu viru hepatitidy B.