



FEDERÁLNY ÚRAD
PRE VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

271 293

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵

C 12 N 15/00

(21) PV 8157-88.L
(22) Prihlásené 09 12 88

(40) Zverejnené 14 11 89
(45) Vydané 25 07 91

(75) Autor vynálezu

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

(54)

Myši lymfocytárny hybridóm VÚ T51/3

(57) Riešenie sa týka myšieho lymfocytárneho hybridómu, produkujúceho monoklonálnu protilátku voči vírusu Herpes simplex typ 1, uloženého v zbierke hybridómov Virologického ústavu SAV v Bratislave pod označením VÚ T51/3. Monoklonálna protilátka produkovaná hybridómom VÚ T51/3 je vhodná na diagnostické účely v imuno fluorescenčnom teste (IF) v rádioimunoanalytickom teste (RIA) a v imunoenzymatickej analýze (ELISA) na stanovenie prítomnosti a množstva vírusového antigénu v testovanom materiáli.

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

U vírusu Herpes simplex rozoznávame dva antigénne odlišné typy Herpes simplex typ 1 a typ 2. Doteraz sa protilátky (antiséra) voči vírusu Herpes simplex typ 1 pripravovali imunizáciou pokusných zvierat, najčastejšie králikov, purifikovaným alebo nepurifikovaným vírusom resp. niektorým izolovaným proteínom /Forghani B., Schmidt N., Lennette E. H.: Solid phase radioimmunoassay for identification of herpesvirus hominis types 1 and 2 from clinical material. Appl. Microbiol. 28, /1974/ 661 - 667; Dreesman G. R., Watson D. O., Courtney R. J., Adam E., Melnick J. L.: Detection of herpesvirus type-specific antibody by microsolid-phase radioimmunometric assay; Intervirology 12, /1979/ 115 - 119). Sérum takto imunizovaných zvierat, odobrané po viacerých dávkách antigénu, slúžilo ako zdroj protilátok tzv. typovošpecifických, ktoré sa využívali na dôkaz antigénu vírusu Herpes simplex typ 1 v základnom výskume a v imunodiagnostickej praxi. Vzhľadom na to, že vírusy Herpes simplex typ 1 a 2 obsahujú nielen typovošpecifické, ale aj typovo spoločné antigénne determinanty, takto pripravené antiséra voči vírusu Herpes simplex obsahujú vysoké hladiny typovospoločných protilátok, ktoré sťažujú resp. úplne znemožňujú správne určenie typu infikujúceho vírusu pri diagnostickom testovaní. Typovospoločné protilátky sa obvykle odstraňujú zo sér vysycovaním s vírusom Herpes simplex typ 2, čo je procedúra veľmi náročná na materiál a navyše len v malom počte prípadov úspešná. Výrobné šarže konvenčných typovošpecifických antisér sa dajú ťažko štandardizovať a bývajú v širokom rozmedzí kvality. V poslednom čase sa s úspechom používajú na typizáciu vírusu Herpes simplex typ 1 monoklonálne protilátky tzv. typovošpecifické, ktoré sú schopné detegovať infekciu vírusom Herpes simplex typ 1 v klinickom materiáli.

Uvedené nevýhody doteraz používaných postupov sa nevyskytnú, ak je k dispozícii hybridómová banková línia produkujúca typovošpecifickú monoklonálnu protilátku voči vírusu Herpes simplex typ 1, ktorá je uložená v zbierke hybridómov Virologického ústavu SAV, Mlynská dolina 1, Bratislava pod označením VÚ T51/3.

Uvedený hybridóm bol získaný spôsobom známym z odbornej literatúry (Kohler, G., Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Natur, 256 /1975/, 495., Gerhard, W.: Fusion of cells in suspension and outgrowth of hybride 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 extraktom buniek infikovaných vírusom Herpes simplex typ 1, boli klonované, a po otestovaní bol vybraný klon VÚ T51/3. Výhodou hybridómu je, že produkuje homogénnu protilátku, tzv. monoklonálnu protilátku, ktorá je schopná špecificky reagovať s vírusom Herpes simplex typ 1. Hybridóm VÚ T51/3 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 T51/3 kultiváciou hybridómov 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 para-fínovým olejom /0,5 ml antraperitoneálne 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. Ascitická tekutina obsahujúca produkt hybridómu VÚ T51/3 vykazovala špecifickú väzbu k vírusu Herpes simplex typ 1 v rádioimunoanalytickom teste /RIA/, v imunoenzymatickej analýze /ELISA/ a v imunofluorescenčnom teste /IF/.

Bunky hybridómu VÚ T51/3 rastú in vitro ako polosuspenzná kultúra. Majú guľatý tvar a veľkosť charakteristickú pre myelómove bunky. Obsahujú fúzovane bunkové jadrá, sú aneuploidne. Bunky hybridómu VÚ T51/3 majú ultraštruktúrny obraz typických myelómových buniek, kde prevažujúcou organelou sú voľné a na membránu viazané polyribozómy. Základným kultivačným médiom je Dulbeccova modifikácia Eagleovho minimálneho esenciálneho média (Dulbecco, R., Freeman, 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 monoklonálna imunoglobín podtriedy IgG 2b.

Hybridóm VÚ T51/3 môže byť využívaný ako zdroj protilátky voči vírusu Herpes simplex typ 1, ktorá sa da použiť na kvalitatívny dôkaz prítomnosti vírusu Herpes simplex typ 1 vo vyšetrovanom materiáli, na kvantitatívne stanovenie množstva infikujúceho vírusu, pri vyhodnocovaní epidemiologickej situácie a ako zdroj protilátky jedinej podtriedy (IgG 2b) pre prípravu antisér špecifických pre uvedenú podtriedu.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Myší lymfocytárny hybridóm VÚ T51/3, produkujúci monoklonálnu protilátku podtriedy IgG 2b voči vírusu Herpes simplex typ 1.