



FEDERÁLNY ÚRAD
PRE VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

270 193

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 15/00

(21) PV 8151-88.Z
(22) Prihlásené 09 12 88

(40) Zverejnené 13 10 89
(45) Vydané 27 02 91

(75)
Autor vynálezu

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

(54)

Myší lymfocytárny hybridóm VÚ 303/4

(57) Riešenie sa týka myšieho lymfocytárneho hybridómu, produkujúceho monoklonálnu protilátku proti glykoproteínu gG vírusu Herpes simplex typ 2, uloženého v zbierke hybridómov Virologického ústavu SAV v Bratislave pod označením VÚ 303/4. Monoklonálna protilátka produkovaná hybridómom VÚ 303/4 je vhodná na diagnostické účely v imuno fluorescenčnom teste (IF) v rádioimunoanalytickom teste (RIA), v imunoenzymatickej analýze (ELISA) a v rádioimunoprecipitačnom teste, na stanovenie prítomnosti a množstva vírusového anti-génu v testovanom materiáli. Je vhodná aj na imunoafinitnú purifikáciu glykoproteínu gG z extraktov infikovaných buniek.

Vynález sa týka nového hybridómu, t.j. hybridného jednobunkového organizmu, zostrojeného fúziou myšej myelómovej bunky Sp2/0 a myšej slezinovej lymfoidnej bunky, produkujúcej protilátku voči glykoproteínu gG vírusu Herpes simplex typ 2.

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 2 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., 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 viacerych dávkach antigénu, slúžilo ako zdroj protilátok tzv. typovošpecifických, ktoré sa využívali na dôkaz antigénu vírusu Herpes simplex typ 2 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 1, 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 2 monoklonálne protilátky tzv. typovošpecifické, ktoré sú schopné detegovať infekciu vírusom Herpes simplex typ 2 v klinickom materiáli.

Uvedené nevýhody doteraz používaných postupov sa nevyskytnú, ak je k dispozícii hybridómová bunková línia produkujúca typovošpecifickú monoklonálnu protilátku voči glykoproteínu gG vírusu Herpes simplex typ 2, ktorá je uložená v zbierke hybridómov Virologického ústavu SAV, Mlynská dolina 1, Bratislava pod označením VÚ 303/4.

Uvedený hybridóm bol získaný spôsobom známym z odbornej literatúry (Kohler, 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. Monoclonal antibodies: A new dimension in Biological analyses. Kennett R.H. a spol., eds. New York, Plenum Press (1980), 370.) Hybridné bunky získané po fúzii myších myelómových Sp2/0 buniek a buniek získaných zo sleziny myši BALB/c imunizovanej extraktom buniek infikovaných vírusom Herpes simplex typ 2, boli klonované a po otestovaní bol vybraný klon VÚ 303/4.

Výhodou hybridómu je, že produkuje homogénnu protilátku, tzv. monoklonálnu protilátku, ktorá je schopná špecificky reagovať s glykoproteínom gG vírusu Herpes simplex typ 2. Hybridóm VÚ 303/4 možno kultivovať in vitro v mediach 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 303/4 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 dnoch 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 303/4 vykazovala špecifickú väzbu k vírusu Herpes simplex typ 2 v rádioimunoanalytickom teste (RIA) a v imunoenzymatickej

analýze (ELISA). Metódou rádioimunoprecipitácie a elektroforézy v polyakrylamidovom géli sa zistila vazba monoklonálnej protilátky na glykoproteín gG vírusu Herpes simplex typ 2.

Bunky hybridómu VÚ 303/4 rastú in vitro ako polosuspenzná kultúra. Majú guľatý tvar a veľkosť charakteristickú pro myelómove bunky. Obsahujú fúzované bunkové jadrá, su aneuploidné. Bunky hybridómu VÚ 303/4 majú ultraštruktúrny obraz typických myelómových buniek, kde prevažujúcou organelou su voľne a na membránu viazané polyribosómy. 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 teľacím 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 IgG 2a.

Hybridóm VÚ 303/4 môže byť využívaný ako zdroj protilátky voči glykoproteínu gG vírusu Herpes simplex typ 2, ktorá sa dá použiť na kvalitatívny dôkaz prítomnosti vírusu Herpes simplex typ 2 vo vyšetrovanom materiáli, na kvantitatívne stanovenie množstva infikujúceho vírusu resp. glykoproteínu gG, pri vyhodnocovaní epidemiologickej situácie, na purifikáciu glykoproteínu gG z extraktov infikovaných buniek pomocou imunoafinitnej chromatografie a ako zdroj protilátky jedinej podtriedy (IgG 2a) pre prípravu antisér špecifických pre uvedenú podtriadu.

PREDMET VYNÁLEZU

Myší lymfocytárny hybridóm VÚ 303/4, produkuje monoklonálnu protilátku podtriedy IgG 2a voči glykoproteínu gG vírusu Herpes simplex typ 2.