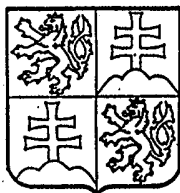


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATÍVNA
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNY ÚRAD
PRE VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

270 192

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl. ⁴

C 12 N 15/00

(21) PV 8150-88.X

(22) Prihlásené 09 12 88

(40) Zverejnené 13 10 89

(45) Vydané 27 02 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)

Myší lymfocytárny hybridóm VÚ T96/4

(57) Riešenie sa týka myšieho lymfocytárneho hybridómu, produkujúceho monoklonálnu protilátku voči glykoproteínu gC vírusu Herpes simplex typ 1, uloženého v zbierke hybridómov Virologického ústavu SAV v Bratislave pod označením VÚ T96/4. Monoklonálna protilátka produkovaná hybridómom VÚ T96/4 je vhodná na diagnostické účely v imunofluorescenčnom teste /IF/ v rádioimunoanalytickom teste /RIA/ a v imunoenzymatickej analýze /ELISA/ na stanovenie prítomnosti a množstva vírusového antigénu v testovanom materiáli. Je vhodná aj na imunoafinitnú purifikáciu glykoproteínu gC 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 gC 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 micro-solid-phase radioimmunoassay: Intervirology 12, /1979/ 115 - 119). Sérum takto imunizovaných zvierat, odobrané po viacerých dávkach 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 typovospoločne antigénne determinanty, takto pripravené antiséra voči vírusu Herpes simplex typ 1 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 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 bunková línia produkujúca typovošpecifickú monoklonálnu protilátku voči glykoproteínu gC vírusu Herpes simplex typ 1, ktorá je uložená v zbierke hybridémov Virologického ústavu SAV, Mlynská dolina 1, Bratislava pod označením VÚ 96/4.

Uvedený hybridém 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 získane po fúzii myších myelómových Sp2/0 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 T96/4. Výhodou hybridómu je, že produkuje homogénnu protilátku, tzv. monoklonálnu protilátku, ktorá je schopná špecificky reagovať s vírusom Herpes simplex typ 1. Hybridóm VÚ T96/4 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 T96/4 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 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 96/4 vykazovala špecifickú väzbu k vírusu Herpes simplex typ 1 v rádioimunoanalytickom teste /RIA/, v imunoenzymatickej analýze /ELISA/ a v imunofluorescenčnom teste /IF/. Metódou rádioimunoprecipitácie a elektroforézy

v polyakrylamidovom géli sa zistila väzba monoklonálnej protilátky na glykoprotein gC vírusu Herpes simplex typ 1.

Bunky hybridómu VÚ T96/4 rastú in vitro ako polosuspenzná kultúra. Maju guľatý tvar a veľkosť charakteristickú pre myelómové bunky. Obsahujú fúzované bunkové jadra, sú aneuploidné. Bunky hybridómu VÚ T96/4 majú ultraštruktúrny obraz typických myelómových buniek, kde prevažujúcou organelou sú voľne a na membránu viazané polyribozómy. Základným kultivačným médiom je Dulbeccoova 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 teliacim sérom (10%, Bioveta, Ivanovice na Hané). Hybridom je kultivovaný pri 37 °C v atmosfére 5% CO₂. Jeho generačná doba je približne 24 h. Produkovaná protilátka je monoklonálny imunoglobulín podtriedy IgG 2b.

Hybridóm VÚ T96/4 môže byť využívaný ako zdroj protilátky voči glykoproteínu gC vírusu Herpes simplex typ 1, ktorá sa da použiť na kvalitatívny dôkaz prítomnosti vírusu Herpes simplex typ 1 vo vyšetřovanom materiále, na kvantitatívne stanovenie množstva infikujúceho vírusu resp. glykoproteínu gC, pri vyhodnocovaní epidemiologickej situácie, na purifikáciu glykoproteínu gC z extraktov infikovaných buniek pomocou imunoafinitnej chromatografie 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 T96/4, produkujúci monoklonálnu protilátku podtriedy IgG 2b voči glykoproteínu gC vírusu Herpes simplex typ 1.

číslo

Opravy ve vytištěných popisech vynálezu

Ve vytištěném popisu vynálezu k autorskému osvědčení
č. 270 192 (PV 8150-88,X) je vlevo dole chybně
vytištěno číslo popisu.

Správně : CS 270 192 B1

TISK-Konrádová
10.10.1991