



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU 269 049

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

(21) PV 8954-88.L
(22) Prihlášené 29 12 88

(40) Zverejnené 14 08 89
(45) Vydané 31 08 90

(11)
(13) B1
(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 15/00

(75)
Autor vynálezu

VAREČKOVÁ EVA RNDr., CSc., BRATISLAVA
BETÁKOVÁ TATIANA RNDr., PEZINOK
RAGAČ PAVOL RNDr., CSc., PREŠOV
MIKLOŠOVÁ MARTA RNDr., ŠARIŠSKÉ MICHAČANY

(54) Myši lymfocytárny hybridóm VU 315/4

(57) Riešenie sa týka myšieho lymfocytárneho hybridómu, produkujúceho protilátku podtriedy IgG 1 proti nukleoproteínu vírusu chrípky A. Hybridóm je uložený v zbierke hybridómov Virologického ústavu SAV v Bratislave pod označením VU 315/4.

Vynález sa týka myšieho lymfocytárneho hybridómu, t.j. hybridného jednobunkového organizmu, zostrojeného bunkovou fúziou myšej myelómovej línie Sp2/0 a myšej slezinovej bunky, produkujúceho protilátku proti vírusu chrípky A.

Protilátky voči proteínom vírusu chrípky sa doteraz pripravujú tak, že vírus resp. jeho izolované proteíny sa opakovane injikujú ako antigén pokusným zvieratám najčastejšie králikom, myšiam, alebo fretkám. Sérum takto imunizovaných zvierat, odobraté po určitej dobe pôsobenia antigénu, slúži ako zdroj protilátok, používaných predovšetkým pre kvantitatívnu alebo kvalitatívnu analýzu antigénu - vírusu chrípky - vo výskume a v imunodiagnostickej praxi.

Tento postup, nazývaný konvenčnou imunizáciou, má niekoľko nevýhod. V sére imunizovaných zvierat sa nachádza heterogénna zmes protilátok, ktorých spektrum je v každom jednotlivom organizme rozne a neopakovateľné. Organizmus spravidla vytvorí okrem protilátok voči žiadanému antigénu i protilátky voči nečistotám antigénového preparátu, ktoré je potrebné zo sér odstraňovať vysycovaním. Výrobné šarže konvenčných sér sa preto dajú ťažko štandardizovať a bývajú v širokom rozmedzí kvality. Pre výrobu každej šarže treba pripraviť čistý imunizačný antigén a ďalšie antigény na vysýtenie balastných protilátok proti nečistotám.

Uvedené nedostatky vyššie zmieneného a dosiaľ používaného postupu odpadnú, ak je k dispozícii hybridóm, produkujúci monoklonálnu protilátku proti nukleoproteínu vírusu chrípky A, uložený v zbierke hybridómov Virologického ústavu SAV v Bratislave, Mlynská dolina 1. pod označením VU 315/4.

Uvedený hybridóm bol získaný spôsobom známym z odbornej literatúry (Köhler 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. In: Monoclonal antibodies. Hybrids: A New Dimension in Biological Analyses. R. H. Kennet, T.J. McKearn, K.B. Bechtol, eds., New York, Plenum Press (1980), 370.) klonovaním súboru hybridných buniek po fúzii myšej myelómovej línie 3p2/0 a buniek, získaných zo sleziny myši kmeňa BALB/c, imunizovaných vírusom chrípky A/Dunedin/4/73 (H3N2).

Výhodou hybridómu podľa vynálezu je, že produkuje homogénnu protilátku, tzv. monoklonálnu protilátku, ktorá je schopná špecificky reagovať s nukleoproteínom chrípkového vírusu typu A. Hybridóm VU 315/4 možno kultivovať in vitro v médiách vhodných pre živočíšne bunky, alebo in vivo v peritoneálnej dutine myši kmeňa BALB/c. Z konzerv, uchovaných v kvapalnom dusíku, možno zahájiť produkciu protilátky bez ďalšej imunizácie antigénom.

Príklad

Pre účel pomnoženia hybridómových buniek in vivo sa aplikovalo 5×10^6 buniek do peritoneálnej dutiny myši. Pre lepšie uchytenie aplikovaných buniek bola myš 15 dní pred prenosom buniek hybridómu premedikovaná parafínovým olejom (0,5 ml intraperitoneálne). Po 20 dňoch rastu hybridómu v peritoneálnej dutine bola myš zabitá a vyprodukovaná ascitická tekutina odobratá. Celkom sa získalo 8 ml ascitickej tekutiny obsahujúcej 5 mg/ml imunoglobulínu. Ascitická tekutina, obsahujúca produkt hybridómu VU 315/4, vykazovala v radioimunoanalytickom teste špecifickú väzbu k vírusom chrípky typu A (napr. subtyp H1, H2, H3), ale nie voči typu B, a v radioimunoprecipitačnom teste sa viazala na nukleoproteín vírusu chrípky A.

In vitro rastú bunky hybridómu ako polosuspenzná kultúra. Majú tvar (guľatý) a veľkosť charakteristické pre myelómové bunky, obsahujú fúzované bunkové jadrá, sú aneuploidné. Bunky hybridómu VU 315/4 majú ultraštruktúrny obraz typických myelómových buniek, kde prevažajúcou organelou sú voľné a na membrány viazané polyribosómy. Základným kultivačným médiom je Dulbeccova modifikácia Eaglovho minimálneho esenciálneho média (Dulbecco, R. a Freeman, G., Virology 8 (1959), 396). Toto médium, označované ako DMEM, je pre kultiváciu hybridómu doplnené gentamycínom a inaktivovaným prekolostrálnym sérom (10%, Bioveta, Ivanovice na Hané). Hybridóm je kultivovaný pri 37 °C - jeho stredná generačná doba je približne 24 h. Produkovaná protilátka je monoklonálny imunoglobulín podtriedy IgG1.

Hybridóm VU 315/4 sa môže priemyselne využívať ako zdroj protilátky proti nukleoproteínu (nukleokapsidovému proteínu) vírusu chrípky A v metódach analytických, preparatívnych alebo diagnostických a to:

- 1) pri kvantitatívnom a kvalitatívnom vyhodnocovaní prítomnosti nukleoproteínu vírusu chrípky A vo vyšetrovanom materiáli (napr. klinické vzorky),
- 2) pri vyhodnocovaní epidemiologickej situácie,
- 3) pri purifikácii nukleoproteínu vírusu chrípky A,
- 4) ako zdroj protilátky jedinej podtriedy (IgG 1) pre prípravu sér špecifických pre uvedenú podtriedu.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Myší lymfocytárny hybridóm VU 315/4, produkujúci monoklonálnu protilátku podtriedy IgG 1 proti nukleoproteínu vírusu chrípky A.