



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 258886

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 15 10 86
(21) PV 7432-86.0

(11) B₁

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 5/00

(40) Zveřejněno 15 01 88

(45) Vydáno 19.04.89

(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 CSAV pod označením HBc 1B H₅G₁. 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 myšního lymfocytárního hybridomu produkujícího protilátky proti korovému antigenu viru hepatitidy B.

Hybridní buněčná linie byla sestavena fúzí buněk myši myelomové linie SP2/0 a myších slezinných lymfoidních 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 myšší 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 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 myši kmene BALB/c, které byly imunizovány korovým antigenem viru hepatitidy B a buněk myši myelomové linie SP2/O. Výhodou hybridomu HBc 18 H₅G₁ 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 H₅G₁ je možno kultivovat in vitro v médiích vhodných pro živočišné buňky a je adaptován pro růst in vivo v peritoneální dutině myši kmene BALB/c. Z konzerv, které jsou uchovávány v kapalném dusíku je možné zahájit produkci protilátky.

Příklad:

Za účelem pomnožení hybridomových buněk in vivo bylo aplikováno 1,5 a 10⁶ 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 usmrcena a naprodukováná ascitická tekutina byla odebrána. Celkem bylo získáno 5 ml ascitické tekutiny, ve které bylo obsaženo přibližně 3 mg/ml imunoglobulinu. Monoklonální protilátka reagovala specificky s korovým antigenem v enzymoimunologickém testu.

Z ascitické tekutiny byl pomocí síranové metody vypurifikován imunoglobulin. Jamky mikrotitračních destiček byly potahovány monoklonální protilátkou produkovanou klonem HBc 18 H₅G₁ 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 H₅G₁ je Eaglovo minimální esenciální medium s Hanksovou solnou směsí doplněné o neesenciální aminokyseliny. Toto medium (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 H₅G₁ produkuje protilátku podtřídy IgG2A, izoelektrický bod je pH 7,3 - 7,6.

Monoklonální protilátka produkovaná klonem HBc 18 H₅G₁ 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 enzymoimunologické testu. Tento hybridom může být průmyslově využíván jako zdroj protilátky proti korovému antigenu v diagnostických soupravách.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Myší lymfocytární hybridom produkující protilátky proti korovému antigenu viru hepatitidy B, uložený ve Sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV,

pod označením HBc 18 H₅G₁.

258886