



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

265 495

(11) (B1)

(13)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 5/00

(22) Přihlášeno 28 08 87

(21) PV 6302-87.D

(40) Zveřejněno 14 03 89

(45) Vydáno 15 12 89

(75)
Autor vynálezu

HLOŽÁNEK IVO MVDr. DrSc., KOREC EVŽEN RNDr. CSc.,
DOSTÁLOVÁ VLASTA prom. biol., STARÁ JANA, MANČAL PETR RNDr., PRAHA,
BYČKO VADIM VASILIEVIČ CSc., RIGA,
GREN ELMAR JANOVIČ prof. DrSc. akademik., LAV, RIGA

(54) **Myší lymfocytární hybridom produkující protilátky proti „core“ antigenu viru hepatitidy B**

(57) Řešení se týká myšího lymfocytárního hybridomu, produkujícího protilátky proti „core“ antigenu viru hepatitidy B (HBcAg), který je uložen ve Sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV pod označením IMG CZAS HBc 13y F9C7. Protilátku lze značit křenovou peroxidázou a využít pro detekci protilátek proti HBcAg třídy IgM v lidských sérech a dále pro detekci a afinitní purifikaci HBcAg.

Vynález se týká myšního lymfocytárního hybridomu produkujícího protilátky proti "core" antigenu viru hepatitidy B (HBcAg).

Hybridní buněčná linie byla sestrojena fúzí buněk myší myelomové linie (SP2/0) a myších slezinných lymfoidních buněk, produkujících protilátky proti HBcAg. HBcAg je strukturální součástí virionu viru hepatitidy B.

Stanovení hladiny protilátek proti HBcAg a jejich rozlišení na protilátky třídy IgM a IgG má zásadní význam pro diagnostiku a monitorování hepatitidy B. Stanovení hladiny celkových protilátek lze provádět pomocí kompetičního enzymoimunologického testu, kdy jamky jsou potahovány HBcAg a je přidáno testované sérum, společně s monoklonální protilátkou značenou křenovou peroxidázou. Stanovení protilátek třídy IgM lze provést pomocí enzymoimunologického testu, následuje přidání testovacího séra, HBcAg a monoklonální protilátky značené křenovou peroxidázou.

Obě tato stanovení lze provádět pomocí značené monoklonální protilátky, produkované hybridomem podle vynálezu, který je uložen ve Sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV, Praha 6, Flemingovo nám. 2 pod označením IMG CZAS Hbc 13y F₉C₇. Uvedené protilátky mohou být rovněž použity pro detekci HBcAg a pro afinitní purifikaci HBcAg. Uvedený hybridom byl získán způsobem známým z odborné literatury (Köhler, G., Milstein, C., Nature 256: 495 až 497) klonováním populace hybridních buněk získaných hybridizací buněk ze sleziny imunizovaných myší kmene BALB/c a buněk myší myelomové linie SP2/0. Myši byly imunizovány HBcAg purifikovaným z bakterií, obsahujících rekombinantní expresní plasmid. Dosud připravené protilátky proti core antigenu viru hepatitidy B produkované hybridomy AO č. 255 642, AO č. 258 886, mají nevýhodu v tom, že po označení těchto protilátek křenovou peroxidázou dochází vždy k určitým ztrátám imunologické aktivity. Tuto nevýhodu odstraňuje použití protilátky produkované hybridomem Hbc 13y F₉C₇ podle vynálezu, kterou lze značit křenovou peroxidázou aniž dochází ke ztrátám imunologické aktivity. Tuto protilátku lze použít k detekci celkové hladiny protilátek a protilátek třídy IgM v lidských sérech, pro detekci a afinitní purifikaci HBcAg. Použití této protilátky umožňuje vyvinutí diagnostické soupravy pro detekci protilátek třídy IgM.

Hybridom Hbc 13y F₉C₇ je možno kultivovat in vitro v médiích vhodných pro živočišné buňky a je adaptován pro růst in vivo v peritoneální dutině myší kmene BALB/c. Z konzerv, které jsou uchovávány v kapalném dusíku, je možné zahájit produkci protilátky.

P ř í k l a d

Za účelem pomnožení hybridomových buněk in vivo bylo aplikováno 1×10^6 hybridomových buněk do peritoneální dutiny myší kmene BALB/c. Těto myši bylo 14 dní před podáním hybridomových buněk aplikováno 0,7 ml parafinového oleje do peritoneální dutiny. Po 15 dnech růstu v peritoneální dutině byla myš usmrcena a naprodukováná ascitická tekutina odebrána. Celkem bylo získáno 5 ml ascitické tekutiny, ve které bylo obsaženo průměrně 5,5 mg/ml protilátky. Monoklonální protilátka specificky reagovala s HBcAg v enzymoimunologickém testu.

Základní kultivační médium pro buňky hybridomu Hbc 13y F₉C₇ je Eaglovo minimální esenciální médium s Hanksovou solnou směsí doplněné o neesenciální aminokyseliny. Toto médium (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 13y F₉C₇ produkuje protilátku podtřídy IgG2A, izoelektrický bod je pH 6,5 až 6,8.

Monoklonální protilátka produkovaná klonem Hbc 13y F₉C₇ reaguje specificky s HBcAg a tuto protilátku lze značit křenovou peroxidázou, aniž dochází ke ztrátám imunologické aktivity. Tuto protilátku lze použít k detekci protilátek třídy IgM v lidských sérech k detekci a afinitní purifikaci HBcAg. Tento hybridom může být průmyslově využíván jako zdroj protilátky proti HBcAg v diagnostických soupravách.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS HBc 13y F₉C₇ produkující protilátky proti "core" antigenu viru hepatitidy B.