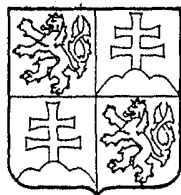


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATÍVNA
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNY ÚRAD
PRE VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

271 292

(11)

(13) 81

(51) Int. Cl.⁵

C 12 N 15/00

(21) PV 8156-88.J

(22) Prihlášené 09 12 88

(40) Zverejnené 14 11 89

(45) Vydané 25 07 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 MICHALANY

(54)

Myši lymfocytárny hybridóm VÚ 440/2

(57) Riešenie sa týka myšieho lymfocytárneho hybridómu, produkujúceho monoklonálnu protilátku voči vírusu Herpes simplex typ 2, uloženého v zbierke hybridómov Virologického ústavu SAV v Bratislave pod označením VÚ 440/2. Monoklonálna protilátka produkovaná hybridómom VÚ 440/2 je vhodná na diagnostické účely v imuno fluorescenčnom teste (IF) v rádioimunoanalytickom teste (RIA) a v imunoenzymatickej analýze (ELISA) na stanovenie prítomnosti a množstva vírusového antigénu v testovanom materiáli.

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

U vírusu Herpes simplex rozoznávajú 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., Lenette 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. J.: Detection of herpesvirus type-specific antibody by microsolid-phase radioimmunometric assay; Intervirology 12, (1979) 115 - 119). Sérum takto imunizovaných zvierat, odobrané po viacerých dávkách antigénu, slúžilo ako zdroj protilátok tzv. typovospecifických, 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 vírusu Herpes simplex typ 2, ktorá je uložená v zbierke hybridomov Virologického ústavu SAV, Mlynska dolina 1, Bratislava pod označením VU 440/2.

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 získane po fúzii myších myelómových Sp2/O 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 VU 440/2.

Výhodou hybridonu je, že produkuje homogennu protilátku, tzv. monoklonálnu protilátku, ktorá je schopná špecificky reagovať s vírusom Herpes simplex typ 2. Hybridóm VU 440/2 možno kultivovať in vitro v médiách 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 antigenom.

Príklad:

Za účelom získania väčšieho množstva monoklonálnej protilátky VU 440/2 kultiváciou hybridomových 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 VU 440/2 vykazovala špecifickú

vazbu k vírusu Herpes simplex typ 2 v radioimunoanalytickom teste (RIA), v imunoenzymatickej analýze (ELISA) a v imunofluorescenčnom teste (IF).

Bunky hybridómu VU 440/2 rastu in vitro ako polosuspenzná kultúra. Majú gulatý tvar a veľkosť charakteristickú pre myelómove bunky. Obsahujú fúzovane bunkové jadrá, sú aneuploidne. Bunky hybridómu VU 440/2 majú ultraštruktúrny obraz typických myelómových buniek, kde prevažujúcou organelou sú voľné 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 prekolostriálnym telacím sérom (10%, Bioveta, Ivanovice na Hane). Hybridóm je kultivovaný pri 37 °C v atmosfére 5% CO₂. Jeho generačná doba je približne 24 h. Produkovaná protilátka je monoklonálny imunoglobulín podtriedy IgG 1.

Hybridóm VU 440/2 môže byť využívaný ako zdroj protilátky voči 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 pri vyhodnocovaní epidemiologickej situácie a ako zdroj protilátky jedinej podtriedy (IgG 1) pre prípravu antisér špecifických pre uvedené podtriedu.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Myší lymfocytárny hybridóm VU 440/2, produkujúci monoklonálnu protilátku podtriedy IgG 1 voči vírusu Herpes simplex typ 2.