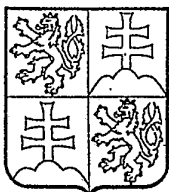


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÁ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNY ÚRAD
PRE VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

(21) FV 1526-89.0
(22) Prihlásené 11 03 89

(40) Zverejnené 13 06 90
(45) Vydané 16 12 91

(11) 272 890

(13) B₁

(51) Int. Cl. ⁵
C 12 N 5/00

(75) Autor vynálezu

ALTANER ČESTMÍR ing. DrSc.
ALTANEROVÁ VERONIKA ing. CSc.
BÁN JOZEF ing. CSc.
GIECIOVÁ EVA ing., BRATISLAVA

(54)

Myší lymfocytárny hybridóm BLV_{gp51}UEO-
-4E9/32E5

(57) Riešenie sa týka myšieho lymfocytárneho hybridómu produkujúceho monoklonálnu protilátku proti obalovému glykoproteínu gp51 bovinnej leukémie uloženého v zbierke hybridómov oddelenia molekulárnej virológie Ústavu experimentálnej onkológie SAV pod označením UEO-4E9/32E5. Samotná monoklonálna protilátka tohoto hybridómu je vhodná hlavne na použitie pre výrobu imunodiagnostických súprav na detekciu hovädzieho dobytku infikovaného vírusom bovinnej leukémie a na detekciu vírusového antigénu. Je taktiež vhodná pre účely preparatívnej ako imunoafinitnej purifikácie vírusového glykoproteínu.

Vynález sa týka nového myšieho lymfocytárneho hybridómu, BLVgp51 UEO-4E9/32E5 t.j. hybridnej bunecnej línie, ktorá bola zostrojená fúziou buniek myšej myelómovej línie Sp2/0 a myších lymfocytárných buniek, produkujúcich protilátky namierené proti obalovému glykoproteínu gp 51 vírusu bovinnej leukémie (BLV). Obalový glykoproteín je dôležitou súčasťou vírusu bovinnej leukémie, je zodpovedný za infektivitu vírusu. Nález anti gp-proti látok u zvierat má zásadný význam pre diagnostiku leukémie hovädzieho dobytku.

Doteraz sa protilátky proti antigénom BLV vyrábajú tak, že purifikovaný gp51 je opakovane injikovaný produkčným zvieratám, najčastejšie králikom. Sérum takto imunizovaných zvierat, odobrané po určitej dobe pôsobenia antigénu, slúži ako zdroj protilátok. Tento postup má mnohé nevýhody, pre každú imunizáciu je nutné izolovať znova glykoproteín gp51 z vírusu, jeho purifikácia je drahá a časovo náročná. Okrem toho v sére imunizovaných zvierat sa nachádza heterogénna zmes protilátok, ktorých spektrum je v každom zvierati rôzne a neopakovateľné. Sérum takto získané obsahuje tiež protilátky voči nečistotám antigénového preparátu, ktoré je potom nutné odstraňovať vysycovaním. Z týchto dôvodov výrobné šarže sa značne odlišujú a kvalita získaných polyklonálnych protilátok nie je štandardná.

Uvedené nedostatky vyše uvedeného postupu konvenčnej imunizácie odpadnú, keď máme k dispozícii hybridóm, produkujúci monoklonálnu protilátku proti obalovému glykoproteínu BLV, ktorý je uložený v zbierke hybridómov oddelenia molekulárnej virológie, Ústavu experimentálnej onkológie SAV v Bratislave, ul. Čsl. armády 21, pod označením UEO-4E9/32E5.

Uvedený hybridóm bol získaný v podstate postupom známym v odbornej literatúre ako hybridómová technológia (Kohler, G., Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* 256, 495, 1975), R.H. Burdon, P.H. VanKnippenberg: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, Vol. 13, Monoclonal Antibody Technology, Elsevier, Amsterdam 1984). Postup, ktorým boli hybridómy pripravené bol nami modifikovaný (O. Orlik, Č. Altaner: Modifications of hybridoma technology yield of monoclonal antibody producing cells, *J. Immunol. Methods*, 115, 55-59, 1988).

Výhodou hybridómu je, že produkuje homogénne monoklonálne protilátky, ktoré reagujú s obalovým glykoproteínom BLV. Hybridóm BLVgp51UEO-4E9/32E5, je možno kultivovať in vitro v médiách vhodných pre živočíšne bunky a súčasne je adaptovaný pre rast in vivo v peritoneálnej dutine myšieho kmeňa BALB/c. Z konzerv, ktoré sú uchovávané v kvapalnom dusíku, je možno zahájiť produkciu protilátky bez ďalšieho antigénu. Protilátka produkovaná klónom BLV gp51-4E9/32E5 reaguje špecificky s determinantom obalového glykoproteínu BLV.

Príklad: Za účelom pomnoženia hybridómových buniek in vivo bolo $2-10 \times 10^6$ buniek injikovaných do peritoneálnej dutiny myši kmeňa BALB/c. Týmto myšiam bolo 14 dní predtým injikované do peritoneálnej dutiny 0.5 ml Pristanu alebo inkompletného Freudova adjuvans za účelom vytvorenia sterilného ascitu, ktorý napomáha rastu injikovaných hybridómových buniek. Po 14 dňoch rastu hybridómových buniek v peritoneálnej dutine, myš bola usmrtená a naprodukovávaná ascitická tekutina bola sterilne odobraná. Celkom sa získalo 8 ml ascitovej tekutiny, ktorá obsahovala 9mg/ml imunoglobulínu. Monoklonálna protilátka reagovala špecificky s glykoproteínom gp51-BLV a s desintegrovateľným vírusom a rádioprecipitačnom teste a rádioimunologickom teste. Z ascitickej tekutiny bol imunoglobulín izolovaný pomocou chromatografie na kolóne Protein A-Sepharose alebo inou vhodnou metódou. Takto purifikovaná monoklonálna protilátka je vhodná pre potahovanie polystyrénových materiálov (mikrotitračné doštičky, polystyrénové tyčinky) za účelom prípravy diagnostických súprav na detekciu BLV infikovaných zvierat.

In vitro rastú bunky hybridómu ako polosuspenzná kultúra. Základným kultivačným médiom je Dulbeccova modifikácia Eaglova minimálneho esenciálneho média doplneného 5 percentami konského alebo iného séra vhodného pre tkáňové kultúry. Hybridóm je kultivovaný pri 37 °C v CO₂ termostate, jeho štandardná generačná doba je približne 24 hodín. Produkovaná protilátka je monoklonálna imunoglobulín podtriedy IgG2b.

Hybridóm BLVgp51UEO-4E9/32E5 môže byť priemyslovo využívaný ako zdroj protilátky proti obalovému glykoproteínu gp51 BLV v diagnostických metódach, v purifikačných metódach a iných aplikáciach.

Konkrétne má využitie: pri výrobe imunodiagnostických súprav na detekciu infekcie hovädzieho dobytku vírusom bovinnej leukémie, pri purifikácii vírusového glykoproteínu imunoafinitnou chromatografiou, pri vyhodnocovaní antigénnej variability vírusového glykoproteínu, ako zdroj protilátky jedinej podtriedy pre prípravu sér, pre detekciu vírusového antigénu v infikovaných zvieratách.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Myší lymfocytárny hybridóm BLVgp51UEO-4E9/32E5, produkujúci monoklonálnu protilátku podtriedy IgG2b proti obalovému glykoproteínu gp51 vírusu bovinnej leukémie.