



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

252 792

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita

(22) Přihlášeno 20 01 86

(21) PV 425 - 86.I

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 15/00

(40) Zveřejněno 12 02 87

(45) Vydáno 30.4.1989

(75)
Autor vynálezu

HLOŽÁNEK IVO MVDr, DrSc.,
KOREC EVŽEN RNDr.,
DOSTÁLOVÁ VLASTA prom.biol.,
KÖNIG JAROSLAV RNDr.,

NĚMEČEK VRATISLAV RNDr.,
MANČAL PETR RNDr.,
~~ZELENÝ~~ VLADIMÍR MUDr., CSc., PRAHA

(54)

Myší lymfocytární hybridom HBs 72C₄A₇

Řešení se týká myšího lymfocytárního hybridomu, produkujícího protilátku proti povrchovému antigenu hepatitidy B, který je uložen ve Sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV pod označením HBs 72C₄A₇. Samotná monoklonální protilátka tohoto hybridomu je vhodná pro detekci povrchového antigenu v enzymoimunologickém testu.

Vynález se týká nového hybridomu, t.j. hybridní buněčné linie, která byla sestrojena fúzí buněk myelomové linie Sp2/0 a myších sleziných lymfoidních buněk, produkujících protilátky proti povrchovému antigenu viru hepatitidy B. Povrchový antigen je důležitou součástí viru hepatitidy B a jeho stanovení má zásadní význam při diagnostice onemocnění.

Dosud se protilátky proti povrchovému antigenu vyrábějí tak, že purifikovaný povrchový antigen je opakovaně injikován produkčním zvířatům, nejčastěji králíkům (kozám). Sérum takto imunizovaných zvířat, odebírané po určité době působení antigenu, slouží jako zdroj protilátek. Tento postup, který je nazýván konvenční imunizace má 2 zásadní neodstranitelné nevýhody. Pro každou imunizaci je nezbytný povrchový antigen, jehož purifikace představuje velmi nákladný a zdravotně rizikový postup. Protilátky proti povrchovému antigenu, ale i protilátky proti lidským sérovým bílkovinám, především proti lidskému sérovému albuminu, přičemž tyto balastní protilátky je nutno odstraňovat.

Nevýhody konvenčních sér proti povrchovému antigenu odstraňuje použití hybridomové technologie. Produkt hybridomu - monoklonální protilátka je namířena proti jediné antigenní determinantě povrchového antigenu a produkce monoklonálních protilátek nevyžaduje imunizaci zvířat antigenem. Použití monoklonální protilátky dále umožňuje zvýšení citlivosti detekční metody ELISA, který je používán pro diagnostiku choroby.

Z publikovaných výsledků je známo, že povrchový antigen viru hepatitidy B není jedinou antigenní složkou, ale představuje komplex několika antigenů. Ve všech izolátech se nachází skupinově specifická determinanta a. Další 2 páry subtypově specifických determinant d/y a r/w se obvykle nevyskytují společně a jsou považovány za alely. (Le Bovier, G.L.: The heterogeneity of Australia antigen, J. Infect. Dis. 123: 671, 1971).

Monoklonální protilátky proti skupinově specifické determinantě a jsou výhodné pro diagnostické použití

Podstatného pokroku v diagnostice hepatitidy B, který se projeví ve vyšší citlivosti a zároveň vyšší spolehlivosti testu, se dosáhne jsou-li k dispozici klonované hybridní buněčné linie produkující monoklonální protilátku proti skupinově specifické a determinantě povrchového antigenu. Takový hybridom je uložen ve Sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV v Praze 6, Flemingovo nám. 2, pod označením HBS 72C₄A₇.

Uvedený hybridom byl získán způsobem známým z odborné literatury (Kunitomo, K., Yahara, S., Saji, H., Hosoi, T.: Monoclonal antibodies to hepatitis B surface antigen (HBsAg) as a tool for the automated HBsAg screening. Vox Sanguinis 45: 104, 1983); klonováním populace hybridních buněk získaných hybridizací buněk ze sleziny myši kmene BALB/c, které byly imunizovány povrchovým antigenem viru hepatitidy B a buněk myši myelomové linie Sp2/O.

Výhodou hybridomů je, že produkují homogenní monoklonální protilátky, které reagují s povrchovým antigenem. Hybridom HBS 72C₄A₇ 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 bez dalšího antigenu. Protilátka produkovaná klonem HBS 72C₄A₇ reaguje specificky s a determinantou povrchového antigenu viru hepatitidy B.

Příklad

Za účelem pomnožení hybridomových buněk in vivo bylo aplikováno 2×10^6 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 naprodukována ascitická tekutina byla odebrána. Celkem bylo získáno 5 ml ascitické tekutiny, ve které bylo obsaženo 10 mg/ml imunoglobulinu. Monoklonální protilátka reagovala specificky s povrchovým antigenem viru hepatitidy B v enzymoimunologickém a radioimunologickém testu.

Z ascitické tekutiny byl purifikován imunoglobulin pomocí síranové metody a tímto imunoglobulinem byly potahovány mikrotitrační destičky v koncentraci 50 ug/ml. Pak byly přidány vzorky vyšetřované na přítomnost povrchového antigenu viru hepatitidy B a konjugát polyklonální protilátky proti povrchovému antigenu s křenuvou peroxidázou a enzymoimunologický test byl dokončen způsobem používaným pro detekci povrchového antigenu pomocí diagnostické soupravy ELISA HBsAg Micro 1 (ÚSOL) viz leták. Použití monoklonální protilátky umožnilo detekci 1,5 ng povrchového antigenu/ml, což představuje dvojnásobné zvýšení citlivosti testu ve srovnání se systémem používajícím konvenční polyklonální protilátky.

Základním kultivačním medium pro buňky hybridomu HBs 72C₄A₇ je Baglovo minimální esenciální medium s Hanksovou solnou směsí doplněné o neesenciální aminokyseliny. Toto médium (označované jako H-MSM_d - Ústav molekulární genetiky ČSAV) je pro kultivaci hybridomů doplněno penicilinem, streptomycinem a inaktivovaným telecím sérem (Bioveta, Ivanovice na Hané). Hybridom je kultivován při 37°C. Hybridom HBs 72C₄A₇ produkuje protilátku podtřídy IgG1, izoelektrický bod je pH 5,2-5,4.

Monoklonální protilátka produkovaná klonem HBs 72C₄A₇ reaguje specificky s povrchovým antigenem viru hepatitidy B. Tento hybridom může být průmyslově využíván jako zdroj protilátky proti povrchovému antigenu v diagnostických soupravách.

P R Ě D M Ě T V Y N Á L E Z U

Myší lymfocytární hybridom HBs 72C₄A₇ produkující monoklonální protilátku podtřídy IgG1 proti povrchovému antigenu viru hepatitidy B