

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

268 403

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 5/00

(21) PV 5403 - 86.X
(22) Přihlášeno 16 07 86

(40) Zveřejněno 12 07 89
(45) Vydáno 31 08 90

(75)
Autor vynálezu

DANIELOVÁ VLASTA RNDr.CSc.,
NĚMEČEK VRATISLAV RNDr.,
JANDEJSEK JAN RNDr.CSc.,
MANČAL PETR RNDr.,
KONIG JAROSLAV RNDr.,
BENDA RUDOLF MUDr.CSc.,
KOREC EVŽEN RNDr., PRAHA

(54)

Myši B-lymfocytární hybridomová produkční
linie HBS - 01 A0 35/86

(57) Řešení se týká nové produkční myši
hybridomové linie HBS-01 vytvářející spe-
cifickou monoklonální protilátku podtří-
dy IgG1 proti povrchovému antigenu vi-
ru hepatitidy B (HBsAg).

Vynález se týká nové produkční hybridomové linie vytvářející specifickou monoklonální protilátku proti povrchovému antigenu viru hepatitidy B /HBsAg/. Hybridom byl sestrojen fúzí buňky myši myelomové linie a myšního lymfocytu, senzibilizovaného antigenem HBs.

Diagnostická séra proti HBsAg jsou základní složkou souboru imunoreagencií, nezbytných pro serologickou diagnostiku onemocnění člověka virovou hepatitidou B a pro zjišťování přítomnosti viru hepatitidy B v krvi a krevních derivátech v transfuzní službě. Tato séra jsou součástí souprav pro detekci HBsAg /SEVATEST ELISA HBsAg - MACRO I nebo ELISA HBsAg MICRO I/, které jsou používány ve zdravotnictví při rutinním vyšetřování krve.

Diagnostická séra používaná pro stanovení HBsAg pomocí uvedených testů jsou hyperimuni králíčí a kozi antiséra, připravovaná dosud opakovanou imunizací zvířat purifikovaným HBsAg, připravovaným z lidských plazem nosičů HBsAg. Příprava HBsAg je značně náročná na materiální, metodické i organizační zajištění výrobního procesu. Nedostatkem tohoto způsobu přípravy hyperimuních antisér je, že některá zvířata nedostatečně reagují na imunizaci HBsAg, čímž dochází k výrobním ztrátám. Vedle žádaných protilátek proti HBsAg se v hyperimuních antisérech mohou vyskytnout i nežádoucí protilátky proti lidským sérovým bílkovinám, které je nutno ze séra odstranit vysycením. Standardizace jednotlivých šarží diagnostických sér je při stávajícím způsobu přípravy obtížná a vždy neúplná, neboť z vlastní podstaty dosavadního způsobu přípravy imunních sér vyplývá, že nelze získat dvě výrobní šarže stejných vlastností.

Dalším nedostatkem vyšetřování HBsAg prováděného pomocí dosud užívaných polyklonálních sér je, že nelze vyloučit chybné výsledky, způsobené nižší citlivostí nebo neočekávanými vlastnostmi diagnostických sér.

Mnohé z uvedených problémů dosud používaného postupu přípravy diagnostických sér i řadu nedostatků vyplývajících z nevhodných vlastností dosud používaných polyklonálních diagnostických sér je možné odstranit zavedením přípravy myších monoklonálních protilátek proti HBsAg produkovaných B-lymfocytárními hybridomy. Hlavním přínosem zavedení monoklonálních protilátek je především zjednodušení a urychlení výrobního postupu, úspora purifikovaného HBs antigenu, standardizace přípravy jednotlivých šarží diagnostických sér, zvýšení citlivosti a specifity vyšetření i zkrácení doby nutné pro provedení diagnostického testu.

Zdrojem monoklonální protilátky proti HBsAg je hybridomová linie HBS-01, uložená ve sbírce hybridomů Ústavu sér a očkovacích látek, Praha 10, W.Piecka 108 pod označením HBS - 01.

Uvedený hybridom byl sestrojen způsobem známým z odborné literatury /S.Fazekas de St. Groth, D. Scheidigger: Production of monoklonal antibodies: Strategy and tactics, J. Immunol. Meth. 35:1, 1980; J. Kalil, D. Crevat, M. Fellous, J. Drouet, A.M. Courouce, C. Ropars: Production d'anticorps monoclonaux anti-HBs. Ann.Immunol. /Inst.Pasteur/ 132c,319,1961/ klonováním souboru hybridních buněk, vzniklých fúzí buněk myši myelomové linie P3-X63-Ag8.653 a senzibilizovaných lymfocytů, získaných ze slezin myši kmene BALB/c, imunizovaných HBsAg.

B-lymfocytární hybridomová linie HBS-01 produkuje zcela homogení protilátky tzv. protilátky monoklonální, které specificky reagují s HBsAg a nikoliv s lidskými plasmatickými bílkovinami. Hybridom HBS - 01 je možné pěstovat v podmínkách buněčné kultury in vitro nebo in vivo v peritoneální dutině myši kmene BALB/c nebo jej dlouhodobě uchovávat při teplotě kapalného dusíku. Monoklonální protilátka produkovaná hybridomem HBS - 01 je specifická pro HBsAg a prostá dalších nežádoucích protilátek.

Buňky hybridomu HBS - 01 jeví ultrastrukturální obraz typických myelomových buněk s volnými i na membránu vázanými polyribosomy. V podmínkách buněčné kultury rostou jako

slabě adherující buňky /polosuspenní kultura/ v médiu MEM nebo RPMI 1640, doplněném 2-merkaptetanolem / 5×10^{-5} M/, 10 % telecího séra pro tkáňové kultury a antibiotiky / 100 j penicilinu, 10 μ g streptomycinu a 40 μ g gentamycinu v 1 ml/při 37 °C. Střední generační doba produkční linie HBS -01 činí 20 hodin. Produkovaná monoklonální protilátka je myší imunoglobulin třídy IgG 1, její izoelektrický bod je 6,6 až 6,8.

Příklad 1

Za účelem pomnožení produkční hybridomové linie HBS - 01 a získání monoklonální protilátky bylo vyseto do kultivační nádoby 1×10^5 buněk /1 ml kultivačního média. Po 3 dnech růstu buněk bylo z kultivační nádoby získáno kultivační médium, obohacené o monoklonální protilátky, vytvořené buňkami produkční hybridomové linie. Monoklonální protilátky reagovaly s purifikovaným HBsAg v radioimunologickém stanovení až do ředění $1 : 10^6$.

Příklad 2

Monoklonální protilátka proti HBsAg byla získána in vivo po inokulaci 5×10^6 buněk hybridomové produkční linie HBS - 01 do peritoneální dutiny myši kmene BALB/c, které bylo 14 dní předem injikováno stejným způsobem 0,5 ml parafinového oleje. Monoklonální protilátky proti HBsAg byly obsaženy v ascitické tekutině, získané z peritoneální dutiny myši za 12 dní po inokulaci buněk. Monoklonální protilátky reagovaly s purifikovaným HBsAg v radioimunologickém stanovení až do ředění $1 : 10^9$. Bylo získáno 5 ml ascitické tekutiny s obsahem imunoglobulinu 12 mg/ml.

P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Myší B-lymfocytární hybridomová produkční linie HBS - 01 A0 35/86 produkující monoklonální protilátku podtřídy IgG1 proti povrchovému antigenu viru hepatitidy B.