



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **27842** (13) **U**
(51) МПК (2006)
C12N 5/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) НАБІР ГІБРИДОМ-ПРОДУЦЕНТІВ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ ДО ПОВЕРХНЕВОГО АНТИГЕНУ ВІРУСУ ГЕПАТИТУ В, ПРИДАТНИХ ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ У ІМУНОФЕРМЕНТНИХ ТЕСТ-СИСТЕМАХ**

1

2

(21) u200709070

(22) 07.08.2007

(24) 12.11.2007

(72) НІКОЛАЄНКО ІГОР ВАСИЛЬОВИЧ, UA

(73) НІКОЛАЄНКО ІГОР ВАСИЛЬОВИЧ, UA

(56)

(57) Набір гібридом-продуцентів моноклональних антитіл до поверхневого антигену вірусу гепатиту В, придатних для використання у

імуноферментних тест-системах, які отримані внаслідок хімічно індукованої гібридизації імунокомпетентних В-лімфоцитів та мієломи Sp 2/0, який **відрізняється** тим, що отримані за довгостроковою схемою імунізації мишей лінії BALB/c характеризуються більшою активністю у імуноферментному аналізі, специфічністю та афінністю моноклональних антитіл.

Корисна модель стосується гібридомної технології та імунобіотехнології і може бути використана для одержання гібридом-продуцентів моноклональних антитіл (МКАТ) специфічних до поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg). Метою корисної моделі є одержання нових гібридом, що продукують високоафінні та високоспецифічні моноклональні антитіла до HBsAg, придатні до використання у імуноферментних тест-системах.

Відомі гібридоми, які продукують моноклональні антитіла до HBsAg [1], які є непридатними для застосування у тест-системах, що побудовані за принципом імуноферментного аналізу та призначені для виявлення HBsAg у сироватці чи плазмі крові людини.

Найбільш близькими до запропонованої корисної моделі є гібридоми, що синтезують моноклональні антитіла специфічні до HBsAg [2]. Проте у порівнянні із вищезгаданими гібридами 331D2, 194G9, 104C4, 264F10, 265F4, 95E1 синтезують моноклональні антитіла, які характеризуються більшою активністю у ІФА, специфічністю та афінністю.

Гібридоми одержані при злитті (гібридизації) клітин мишачої мієломи Sp 2/0-Ag-14 (скорочено- Sp 2/0) та імунокомпетентних В-лімфоцитів мишей лінії Balb/c та мають типову морфологію лімфоїдних клітин. Можуть культивуватися in vitro та in vivo, в організмі мишей. Характеристика МКАТ, які продукуються гібридомами наведена у Таблиці 1.

Характеристика моноклональних антитіл до HBsAg, які про

Назва гібридоми	Ізотоп МКАТ	Константа афінності МКАТ, $\times 10^{10} \text{M}$	Титр МКАТ у культуральній рід
95E1	IgG _{2a}	3,1	1:800
264F10	IgG _{2b}	0,9	1:1000
265F4	IgG _{2b}	1,0	1:1000
104C4	IgG _{2a}	2,0	1:500
194G9	IgG ₁	3,0	1:1000
331D2	IgG ₁	4,0	1:1000

Приклад 1. Одержання гібридом (процедура гібридизації) [3, 4].

Тварину-донора імунокомпетентних лімфоцитів вибирали за результатами титрування сироваток мишей. Селезінку після забою миші стерильно видаляли та м'яко гомогенізували в середовищі з 10% ембріональної телячої сироватки (ЕТС). Для лізису еритроцитів селезінки клітини після центрифугування ресуспендували в 0,83% розчині хлориду амонію. Спленоцити витримували 3хв. при 4°C і осаджували при 1500об/хв. 5хв. Потім ще раз відмивали середовищем без сироватки, ресуспендували в 15мл DMEM та підраховували кількість життєздатних клітин у камері Горяєва.

Таким чином одержували $(3-5) \times 10^8$ лімфоцитів із високою життєздатністю за результатами виключення тріпанового синього. Їх змішували з

(11) **27**
(19) **UA**

мієломними клітинами у співвідношенні 2:1 і центрифугували при 1000об/хв протягом 12хв у пробірці ємністю 50мл. Середовище майже повністю видаляли, а клітинний осад старанно розбивали, постукуючи пробіркою по столу ламінарного боксу. Потім у суспензію клітин вносили 1мл 40% розчину ПЕГ з 5% ДМСО.

Суміш клітин витримувати в середовищі з ПЕГ 5хв при кімнатній температурі і центрифугували при 1000об/хв 2хв. Потім суспензію повільно розводили середовищем DMEM без сироватки до об'єму 50мл. До суспензії додавали 3мл ETC. Клітини після зливання осаджували при 1000об/хв 15хв. Надосад відсмоктували, а осад обережно ресуспендували у повному ростовому середовищі DMEM з 15% ETC і 50мкг/мл гентаміцину. Концентрацію клітин доводили до $(1-2) \times 10^6$ /мл і вносили в 96-лункові планшети по 100мкл на лунку.

Приклад 2. Зберігання гібридом у рідкому азоті.

Для зберігання гібридом-продуцентів використовували кріосередовище, що містить 5% ДМСО, 50% ETC та 45% DMEM.

В одну ампулу вносили від 10^5 до 2×10^6 клітин, які суспендували в 1мл кріосередовища, шляхом змивання моношару з 1-2 лунок 24-лункового планшету. Потім ампули поміщали в контейнер із теплоізоляційного матеріалу і повільно охолоджували до мінус 70°C. На другу добу ампули переносили в резервуар з рідким азотом. Таким чином, кріоконсервацію проводили по двоетапній схемі.

Приклад 3. Клонування гібридом

Гібридами клонували методом лімітувальних розведень [5]. Суть його полягає у поступовому розведенні клітинної суспензії, поки концентрація не досягне однієї або менше клітин на лунку. Клонування проводили на 96-лункових плашках, на які попередньо вносили фідер із перитонеальних макрофагів по 100мкл на лунку.

Із суспензії гібридом відбирали об'єм від 1 до 10мкл, у залежності від вихідної концентрації клітин, і розводили до 3мл повним ростовим середовищем. Розносили по 100мкл на 1/4 частину плашки. Потім ще тричі повторювали розведення до заповнення всієї плашки. Таким чином, сумарний об'єм середовища в лунках становив 200мкл. У результаті отримували чотири різні концентрації клітин. У якомусь із розведень обов'язково росли ізольовані клони, які після тестування, пересаджували або знову клонували.

Приклад 4. Одержання асцитичної рідини.

Для накопичення значної кількості МКАТ гібридами культивували у черевних порожнинах мишей. Для цього за 10-14 днів до ін'єкції клітин мишам вводили внутрішньочеревно по 0,5мл пристану. Мінеральне масло слугувало сильним стимулятором асцитотворення. Потім вводили від 2×10^6 до 10^7 гібридом в 1мл середовища. Через 5-8 днів у мишей починала накопичуватися рідина в черевній порожнині. Її відбирали шляхом проколювання черевної стінки товстою голкою. З однієї миші за кілька разів вдавалося отримати від 5 до 10мл асцитичної рідини. Після

центрифугування при 3000об/хв. протягом 5 хвилин асцит зберігали в замороженому стані.

Літературні посилання:

1. Qian W., Yao D., Yu F. et al. Immobilization of antibodies on ultraflat polystyrene surfaces //Clinical Chemistry. - 2000. - Vol. 46. - P 1456-1463.

2. Канев А.Н., Бондарчук В.Б., Матвеев Л.Э. и др. Получение и отбор моноклональных антител для выявления поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотках крови // Вопросы вирусологии. - 2002. - Том 47, №1. - С.15-21.

3. Ніколаєнко І.В. Отримання та порівняльний аналіз гібридом-продуцентів моноклональних антитіл, що диференціюють вакцинні та вірулентні поліовіруси I, II та III типів: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Київ, 1999. - 18с.

4. Широбоков В.П., Ніколаєнко І.В., Копаниця Л.В. та ін. Панель моноклональних антитіл для внутрішньотипової диференціації поліовірусів II типу // Мікробіол. журн. - 1997. - №6. - С.27-35.

5. Goding J. Monoclonal antibodies. Principles and practice. - San Diego: Academic press, 1996. - 492p.