



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **28629** (13) **U**
(51) МПК (2006)
C12N 5/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) НАБІР ГІБРИДОМ-ПРОДУЦЕНТІВ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ ДО НУКЛЕОКАПСИДНОГО АНТИГЕНУ Р24 ВІРУСУ ІМУНОДЕФІЦИТУ ЛЮДИНИ, ПРИДАТНИХ ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ У ІМУНОФЕРМЕНТНИХ ТЕСТ-СИСТЕМАХ

1

2

(21) u200709076

(22) 07.08.2007

(24) 10.12.2007

(72) НІКОЛАЄНКО ІГОР ВАСИЛЬОВИЧ, UA

(73) НІКОЛАЄНКО ІГОР ВАСИЛЬОВИЧ, UA

(56)

(57) Набір гібридом-продуцентів моноклональних антитіл до нуклеокапсидного антигену р24 вірусу імунодефіциту людини, 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 високою 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 нуклеокапсидного антигену р24 вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ). Метою корисної моделі є одержання нових гібридом, що продукують високоафінні та високоспецифічні моноклональні антитіла до антигену р24 ВІЛ, придатні до використання у імуноферментних тест-системах.

Відомі гібридоми, які продукують моноклональні антитіла до антигену р24 ВІЛ [1], які є непридатними для застосування у тест-системах, що побудовані за принципом імуноферментного аналізу та призначені для виявлення антигену р24 ВІЛ у сироватці чи плазмі крові людини.

Найбільш близькими до запропонованої корисної моделі є гібридоми, що синтезують моноклональні антитіла специфічні до антигену р24 ВІЛ [2]. Проте у порівнянні із вищезгаданими гібридами 284C6, 282H10, 284G7, 286D3, 284H3 характеризуються більшою активністю у ІФА, специфічністю та афінністю моноклональних антитіл, що продукують.

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 Таблиц 1.

Характеристика моноклональних антитіл до а
які продукують одержані гібридо

Назва гібридоми	Ізотип МКАТ	Константа афінності МКАТ, $\times 10^{10} \text{M}$	Титр МКА культуральні
284C6	IgG ₁	5,0	1:2000
282H10	IgG ₁	10,0	1:1000
284G7	IgG ₁	11,0	1:2000
286D3	IgG ₁	5,0	1:1000
284H3	IgG ₁	10,0	1:800

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.

(11)
UA
(19)

Таким чином одержували $(3-5) \times 10^8$ лімфоцитів із високою життєздатністю за результатами виключення тріпанового синього. Їх змішували з 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 витримували 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 ЕТС. Клітини після зливання осаджували при 1000об/хв 15хв. Надосад відсмоктували, а осад обережно ресуспендували у повному ростовому середовищі DMEM з 15% ЕТС 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% ЕТС 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 планшета. 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 33мл 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. Ehrhard B., Misselwitz R., Welfle K. et al. Chemical Modification of Recombinant HIV-1 Capsid Protein p24 Leads to the Release of a Hidden Epitope Prior to Changes of the Overall Folding of the Protein //Biochemistry. - 1996. - Vol. 35. - P.9097-9105.

2. Stevens P.W., HansenFrancis C, Jolley M.E. et al. Monoclonal antibodies to HIV-1 p24 core protein include pairs which exhibit synergistic binding //Molecular Immunology. - 1993. - Vol. 30, 3. - P.243-254.

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: Acedemic press, 1996. - 492p.