



УКРАЇНА

(19) UA (11) 26765 (13) U  
(51) МПК (2006)  
C12N 5/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ИНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту(54) МОНОКЛОНАЛЬНІ АНТИТІЛА ДО НУКЛЕОКАПСИДНОГО АНТИГЕНУ Р24 ВІРУСУ ІМУНОДЕФІЦИТУ  
ЛЮДИНИ, ПРИДАТНІ ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ У ІМУНОФЕРМЕНТНИХ ТЕСТ-СИСТЕМАХ

1

2

(21) u200704443

(22) 23.04.2007

(24) 10.10.2007

(72) НІКОЛАЄНКО ІГОР ВАСИЛЬОВИЧ, UA,  
ГАЛКІН ОЛЕКСАНДР ЮРІЙОВИЧ, UA(73) НІКОЛАЄНКО ІГОР ВАСИЛЬОВИЧ, UA,  
ГАЛКІН ОЛЕКСАНДР ЮРІЙОВИЧ, UA

(56)

(57) Моноклональні антитіла до нуклеокапсидного  
антигену р24 вірусу імунодефіциту людини,

придатні для використання у імуноферментних  
тест-системах, належать до класу імуноглобулінів  
миші, продукуються гібридомами, які одержані  
внаслідок хімічно індукованої гібридизації  
імунокомпетентних В-лімфоцитів та мієломи Sp  
2/0, які отримані за довгостроковою схемою  
імунізації мишей лінії BALB/c, характеризуються  
високими константою афінності й титром у  
культуральній рідині.

Корисна модель стосується імунохімії та  
гібридомної технології і може бути використаний  
для одержання моноклональних антитіл (МКАТ) до  
нуклеокапсидного антигену вірусу імунодефіциту  
людини (ВІЛ) та їхніх імуноферментних кон'югатів.  
Метою винаходу є одержання нових  
моноклональних антитіл до р24 ВІЛ, придатних  
для використання у імуноферментних тест-  
системах.

Відомі МКАТ до білку р24 вірусу імунодефіциту  
людини [1]. Проте згадані моноклональні антитіла  
непридатні для використання у імуноферментних  
тест-системах для серологічної діагностики.

Найбільш близьким до запропонованих є  
моноклональні антитіла, які взаємодіють із білком  
р24 вірусу імунодефіциту людини [2].

У порівнянні із вищезгаданим антитілами  
клони 282Н10, 284G7 характеризуються більшою  
специфічністю та активністю у імуноферментному  
аналізі.

Моноклональні антитіла продукуються  
гібридними клітинами, що одержані при злитті  
мієломних мишачих клітин Sp 2/0 та спленоцитів  
мишей лінії Balb/c. Клони МКАТ 282Н10, 284G7  
характеризуються наступними ознаками (таблиця  
1).

Таблиця 1.

Назва МКАТ	Ізотип МКАТ	Константа афінності, ×1010 моль/л	Титр антитіл у культуральній рідині*
---------------	----------------	--	--

282Н10	IgG <sub>1</sub>	9,0	1:1000
284G7	IgG <sub>1</sub>	10,0	1:2000

"тестування у непрямому твердофазному ІФА на  
р24 ВІЛ (сорбція 0,2мкг/мл)

Приклад 1. Одержання асцитичної рідини із  
вмістом моноклональних антитіл 282Н10. 284G7.

Черевину миші Balb/c обробляли спиртом та  
внутрішньочеревно вводили по 0,5мл пристану  
(Sigma, США, кат. номер Т7640) за допомогою  
стерильного скляного шприца на 1мл або 2мл;  
використовували стерильні голки «Рекорд» 0,5 ×  
10-15мм. Мишей витримували 3-4 тижні.  
Процедуру праймування проводили у гумових  
рукавичках.

Кріопробірки з замороженими клітинами  
діставали з судини Дюара із рідким азотом,  
витримували на повітрі 2-3 хвилини та занурювали  
у воду із температурою 37-40°C. Пробірки  
витримували у воді до тих пір, поки повністю  
розтане лід. Після цього за допомогою піпетки на  
1мл суспензії гібридом переносили у пробірки на  
15мл (Nunc, кат. номер 366060), повільно  
додавали 10-15мл середовища DMEM (Sigma,  
США, кат. номер D 5648) без сироватки.  
Центрифугували при 1300об/хв. протягом 3хв. Над  
осад видаляли, а осад клітин ресуспендували у  
10мл середовища DMEM (Sigma, США, кат. номер  
D 5648) без сироватки. Суспензію переносили у  
"пеніциліновий" флакон та закривали пробкою.

Суспензію клітин перемішували та набирали у  
стерильний шприц по 1мл, вводили у черевну  
порожнину мишей (справа або зліва від

(13) U  
(11) 26765  
(19) UA

серединної лінії на 1см нижче від реберної дуги), яка за 3-4 тижні до цього була праймована пристаном. Мишей залишали на 5-10 днів для накопичення у черевній порожнині асцитичної рідини.

Дану процедуру проводили у гумових рукавичках.

Через 5-10 днів після введення мишам суспензій гібридом у очеревинних порожнинах спостерігалось накопичення асцитичних рідин. Для її відбору використовували трубку спеціальної голки довжиною 4см. Голки стерилізували шляхом обробки етиловим спиртом (70%) протягом 10хв. Черевину миші обробляли спиртом та робили голкою прокол справа або зліва від серединної лінії на 1см нижче від реберної дуги, відбирали асцитичну рідину у пробірку на 15мл (Nunc, кат. номер 366060). Після відбору рідини місце проколу обробляли спиртовим розчином йоду та на 1хв. затискали пінцетом. Повторний підбір асцитичної рідини проводили через 2-3 дні. Процедуру відбору асциту проводили доти, доки тварина залишалася живою. У середньому одна миша здатна дати 2-5мл асциту за один відбір. Асцитичну рідину центрифугували у пробірці на 15мл (Nunc, кат. номер 366060) при 5000об/хв. упродовж 5хв. Відбирали освітлену фракцію та зберігали у флаконах при мінус 20°C.

Процедуру відбору асциту проводили у гумових рукавичках.

Приклад 2. Виділення та очистка моноклональних антитіл 282Н10, 284G7 Розморожували асцитичну рідину із вмістом моноклональних антитіл та переносили її у центрифужну пробірку на 15мл. Пробірку поміщали у нагріту до 37°C воду на 10 хвилин. Зважували сульфат натрію в кількості, потрібній для 18%-го насичення (вага на об'єм) асцитичної рідини, всипали у пробірку з асцитом та старанно струшували до розчинення сульфату натрію. Спостерігали помутніння, зумовлене випадінням в осад МКАТ. Пробірку центрифугували при 10000об./хв впродовж 5 хвилин у кутовому роторі. Після чого надосад видаляли, а осад антитіл розводили у 5мл деіонізованої води. Пробірку поміщали у нагріту до 45 - 50°C воду на 5 хвилин.

Знову зважували сульфат натрію у кількості, потрібній для 16%-го насичення (вага на об'єм) розчину антитіл, всипали у пробірку та старанно струшували до розчинення сульфату натрію. Спостерігали помутніння, зумовлене випадінням антитіл в осад. Пробірку центрифугували при 10000об./хв впродовж 5 хвилин у кутовому роторі. Після чого надосад видаляли, а осад антитіл розводили у 2-3мл деіонізованої води.

Одержаний розчин МКАТ фільтрували через фільтри з порами 0,22мкм.

Для переведення МКАТ у фосфатний буфер використовували 0,02М фосфатний буфер (pH 7,2-7,4) та колонку 1,5×20см з сефадексом G-25 зрівноважену фосфатним буфером. МКАТ, одержані раніше, в об'ємі 2-3мл наносили на гель, після поглинання розчину гелем наносили такий же об'єм буферу. Після поглинання гелем буферу колонку заповнювали фосфатним буфером доверху, вставляли адаптер та проводять елюцію

фосфатним буфером із швидкістю мл/хв. Вихід пігу реєстрували при 280нм. Збирали фракцію МКАТ в окремий флакон, додавали 1% 10%-ого азиду натрію та зберігали при плюс 4°C до 6 місяців.

Приклад 3. Використання моноклональних антитіл 282Н 10, 284G7 у складі імуносорбенту тест-систем для виявлення антигену р24 ВІЛ у сироватках чи плазмі крові людини.

Для одержання імуносорбенту сорбцію МКАТ 282Н10 або 284G7 у полістиролових планшетах проводили у 0,05М карбонат-бікарбонатном буфері (pH 9,6) протягом ночі при 4°C в концентрації 5мкг/мл. Для відмивання використовували фосфатно-сольовий буфер з детергентом (ФСБД), pH 7,2-7,4. У лунки приготовленого імуносорбенту вносили 100мкл досліджуваних сироваток та 50мкл кон'югату поліклональний антитіл до р24 ВІЛ з біотином та інкубували при 37°C упродовж 60 хвилин та відмивали ФСБД 6 разів. Далі в лунки вносили по 100 мкл розчину кон'югату стрептавідину й пероксидази хрому та інкубували при 37°C упродовж 30 хвилин. Далі в лунки вносили по 100мкл розчину хромогену - 3,3',5,5'-тетраметилбензидину - й інкубували при 18-25°C в темному місті протягом 30 хвилин, після чого реакцію зупиняли внесенням у всі лунки по 100мкл стоп-реагенту. Через 5 хвилин після зупинення реакції визначали оптичну густину при 450нм/620нм.

Приклад 4. Використання моноклональних антитіл 282Н10, 284G7 у складі імуносорбенту тест-систем для одночасного виявлення антигену р24 ВІЛ й антитіл до ВІЛ у сироватках чи плазмі крові людини.

Для одержання імуносорбенту сорбцію МКАТ 282Н10 або 284G7 у полістиролових планшетах проводили у 0,05М карбонат-бікарбонатном буфері (pH 9,6) протягом ночі при 4°C в концентрації 5мкг/мл. Для відмивання використовували ФСБД. У лунки приготовленого імуносорбенту вносили 100мкл досліджуваних сироваток, 50мкл кон'югату поліклональний антитіл до р24 ВІЛ з біотином та кон'югату антигенів ВІЛ з пероксидазою хрому й інкубували при 37°C упродовж 60 хвилин та відмивали ФСБД 6 разів. Далі в лунки вносили по 100мкл розчину кон'югату стрептавідину й пероксидази хрому та інкубували при 37°C упродовж 30 хвилин. Далі в лунки вносили по 100мкл розчину хромогену - 3,3',5,5'-тетраметилбензидину - й інкубували при 18-25°C в темному місті протягом 30 хвилин, після чого реакцію зупиняли внесенням у всі лунки по 100мкл стоп-реагенту. Через 5 хвилин після зупинення реакції визначали оптичну густину при 450нм/620нм.

Перелік літературних джерел:

1. Welflea K., Misselwitz R., Hausdorf G. et al. Conformation, pH-induced conformational changes, and thermal unfolding of anti-p24 (HIV-1) monoclonal antibody CB4-1 and its Fab and Fc fragments // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. - 1999. - Vol. 1431, 1. - P. 120 - 131.

2. Stevens P., Francis C., Jolley M. 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. Tijssen P. Preparation of enzyme-antibody or enzyme-macromolecule conjugates // Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: practice and theory of enzyme immunoassays / Editors R.H. Burdon, P.H. van Knippenberg. - Amsterdam: Elsevier, 1985. - P. 221 - 241.