



УКРАЇНА

(19) UA (11) 26766 (13) U

(51) МПК (2006)

C12N 5/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту(54) МОНОКЛОНАЛЬНІ АНТИТІЛА ДО ПОВЕРХНЕВОГО АНТИГЕНУ ВІРУСУ ГЕПАТИТУ В, ПРИДАТНІ
ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ У ІМУНОФЕРМЕНТНИХ ТЕСТ-СИСТЕМАХ

1

2

(21) u200704444

(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 поверхневого
антигену вірусу гепатиту В, 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, титром у культуральній рідині та титром пероксидазного кон'югату.

Корисна модель стосується імунохімії, гібридної технології та біотехнології і може бути використаний для одержання моноклональних антитіл (МКАТ) до поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg) та їхніх імуноферментних кон'югатів. Метою корисної моделі є одержання нових моноклональних антитіл до поверхневого антигену вірусу гепатиту В, придатних для використання у імуноферментних тест-системах.

Відомі МКАТ до поверхневого антигену вірусу гепатиту В [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 HBsAg [2].

У порівнянні із вищезгаданими антитілами клон 95E1 характеризується 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. Клон МКАТ 95E1 характеризується константою афінності $4,0 \times 10^{10}$ моль/л, титром у культуральній рідині 1:1000, титром пероксидазного кон'югату 1:100000 та має ізотип IgG_{2a}.

Приклад 1. Одержання асцитичної рідини із вмістом моноклональних антитіл 95E1

Черевину миші Balb/c обробляли спиртом та внутрішньочеревно вводили по 0,5 мл пристану

(Sigma, США, кат. номер T7640) за допомогою стерильного скляного шприца на 1мл або 2мл; використовували стерильні голки «Рекорд» 0,5 x 10-15мм. Мишей витримували 3-4 тижні. Процедурі праймування проводили у гумових рукавичках.

Кріопробірки з замороженими клітинами клонів 95E1 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 1 мл суспензії гібридом переносили у пробірки на 15 мл (Nunc, кат. номер 366060), повільно додавали 10-15 мл середовища DMEM (Sigma, США, кат. номер D 5648) без сироватки. Центрифугували при 1300 об/хв. протягом 3хв. Надосад видаляли, а осад клітин ресуспендували у 10 мл 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 серединної лінії на 1см нижче від реберної дуги), яка за 3-4 тижні до цього була праймована пристанем. Мишей залишали на 5-10 днів для накопичення у черевній порожнині асцитичної рідини.

Дану процедуру проводили у гумових рукавичках.

(13) U

(11) 26766

(19) UA

Через 5-10 днів після введення мишам суспензій гібридом 95E1 у очеревинних порожнинах спостерігалось накопичення асцитичних рідин. Для її відбору використовували трубку спеціальної голки довжиною 4 см. Голки стерилізували шляхом обробки етиловим спиртом (70%) протягом 10хв. Черевину миші обробляли спиртом та робили голкою прокол справа або зліва від серединної лінії на 1 см 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 підбору 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 5000 об/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 95E1 Розморожували асцитичну рідину та переносили її у центрифужну пробірку та освітлювали при 4000об/хв. протягом 30хв. Після цього асцитичну рідину фільтрували через фільтри з порами 0,45мкм (Sigma, США, кат. номер F8273).

Для афінної очистки використовували колонку з білком А-сефарозою об'ємом 10мл. Перед нанесенням асцитичної рідини колонку промивали із швидкістю 1,5-2мл/хв 5-10 об'ємами 0,02М натрій-калій фосфатного буферу, рН 7,0-7,2 (KH₂PO₄ та Na₂HPO₄). Фільтровану асцитичну рідину в об'ємі 20мл пропускали через колонку зі швидкістю 1мл/хв. Після цього промивали колонку 10-15 об'ємами фосфатного буферу. Елюцію проводили за допомогою 0,1М лимонної кислоти в об'ємі 15мл. Вихід МКАТ 95E1 реєстрували при 280нм. Пік, який виходить із колонки збирали у флакон, що містив 2мл 1М трис основи. рН одержаного розчину мав становити 7,0-8,0, що контролювали за допомогою індикаторного паперу. Значення рН коректували додаванням кислоти або трис-основи. Після виходу піка колонку промивали із швидкістю 1,5-2мл/хв 10-20 об'ємами 0,02М натрій-калій фосфатного буферу до нейтрального рН.

МКАТ 95E1 концентрували за допомогою насиченого розчину сульфату амонію. Для цього до охолодженого препарату МКАТ 95E1 додавали насичений розчин сульфату амонію до 40-50% насичення. Витримували на холоді (4°C) 2-3 години, після чого центрифугували 20хв при 4000об/хв. при кімнатній температурі. Осад МКАТ ресуспендували в розчині сульфату амонію 40%-ого насичення та переносили у центрифужні пробірки на 15мл (Nunc, кат. номер 366060). Центрифугували у кутовому роторі при 10000 об/хв. протягом 20хв. Надосад старанно видаляли, а осад МКАТ 95E1 розчиняли в мінімальній кількості (1-2мл) деіонізованої води. Розчин переносили у мікропробірки та освітлювали при

10000об/хв. протягом 10хв. Освітлені МКАТ 95E1 переносили до спільного флакону. Концентрація МКАТ 95E1, одержаних таким способом, коливається від 20 до 40мг/мл.

Одержаний розчин МКАТ 95E1 фільтрували через фільтри з порами 0,45мкм (Sigma, США, кат. номер F8273).

Стандартний фосфатний буфер (рН 7,2-7,4) фільтрували через фільтри з порами 0,45мкм (Sigma, США, кат. номер F8273). Використовували колонку 1,5 x 20см з сефадексом G-25 (Amersham Pharmacia Biotech, 17-0033-01) зрівноважену фосфатним буфером шляхом пропускання його із швидкістю 2мл/хв. протягом 20хв. МКАТ 95E1 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 проводили елюції фосфатним буфером із швидкістю 2мл/хв. Вихід піку реєстрували при 280нм. Збирали фракцію МКАТ 95E1 в окремий флакон, додавали 1% 10%-ого азиду натрію та зберігали при плюс 4°C до 4 місяців.

Приклад 3. Спосіб одержання кон'югату моноклональних антитіл 95E1 з пероксидазою хрону

Кон'югацію МКАТ з пероксидазою хрону здійснювали у співвідношенні антитіл до ферменту 2:1 (масові долі) методом періодатного окислення за Tijssen [3] із власними модифікаціями.

При окисленні пероксидазу хрону розчиняли у 0,1М бікарбонатному буфері до концентрації 15мг/мл та додавали такий же об'єм 14мМ водного розчину періодату натрію. Суміш інкубували протягом 2 годин при кімнатній температурі. Одержаний таким чином розчин активованої пероксидази додавали до розчину антитіл, які попередньо діалізували проти 0,1М карбонатного розчину, рН 9,2. Суміш переносили у герметичну хроматографічну колонку та додавали 1/3 частину сухого сефадексу G25, інкубували протягом 3 годин при кімнатній температурі.

По закінченні інкубації, розчин кон'югату елювали з колонки та зупиняли реакцію додаванням 1/20 об'ємні частини водного розчину NaBI-L» (5мг/мл), залишаючи на 30хв. при кімнатній температурі. Після цього ще додавали 3/20 частини розчину боргідриду натрію, інкубували протягом 60хв. Одержаний розчин пероксидазного кон'югату МКАТ переводили у 0,02М фосфатний буфер з 0,15М NaCl шляхом діалізу.

Приклад 4. Використання кон'югату моноклональних антитіл 95E1 з пероксидазою хрону у тест-системі для виявлення поверхневого антигену вірусу гепатиту В

У лунки імуносорбенту вносили досліджувані сироватки (100мкл) та попередньо розведений 1:11 розчин кон'югату моноклональних антитіл (50мкл).

Планшет інкубували при 42°C упродовж 120 хвилин та відмивали фосфатно-сольовим буфером з детергентом (ФСБД) 6 разів. 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 45нм/62нм.

Джерела інформації:

1. Zhenga X., Weinberger K., Gehrke R. et al. Mutant hepatitis B virus surface antigens (HBsAg) are immunogenic but may have a changed specificity // *Virology*. -2004. - Vol. 329, 2. - P. 454 - 464.

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. 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.