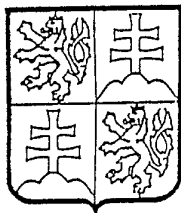


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu :

277142

(21) Číslo přihlášky : 5554-90

(22) Přihlášeno : 12.11.90

(30) Prioritní data :

(13) Druh dokumentu : B6

(51) Int. Cl.⁵ :

C 12 N 5/18

(40) Zveřejněno : 13.05.92

(47) Uděleno : 30.09.92

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 18.11.92

(73) Majitel patentu : Virologický ústav SAV, Bratislava, CS

(72) Původce vynálezu : Kontsek Peter RNDr. CSc., Senec, CS;
Novák Michal MVDr. CSc., Bratislava, CS;
Borecký Ladislav akademik, Bratislava, CS;
Kontseková Eva RNDr., Senec, CS

(54) Název vynálezu : Myší hybridóm IFNA1-48 produkující monoklonální protilátku

(57) Anotace :

Príprava novej homogénnej protilátky, ktorá neutralizuje a viaže ľudský interferon alfa 1 a nerozlišuje iné subtypy ľudského interferonu alfa. Uvedeného účelu sa dosiahne použitím nového myšieho hybridómu IFNA1-48, produkujúceho monoklonálnu protilátku imunoglobulínovej podtriedy G1 voči rekombinantnému ľudskému interferonu alfa 1. Myší hybridóm IFNA1-48 sa využíva v imunodiagnostike a pri čistení ľudského interferonu alfa 1.

Vynález sa týka nového myšieho hybridómu IFNA1-48 produkujúceho monoklonálnu protilátku, ktorá neutralizuje a viaže ľudský interferon alfa 1.

Protilátky voči ľudskému interferonu alfa i sa pripravujú vo forme antisér alebo monoklonálnych protilátok. Antiséra sa získavajú imunizáciou pokusných zvierat purifikovaným antigénom (ľudským interferonom alfa 1). Takto pripravené protilátky sú neštandardné a jednotlivé šarže antisér majú rozdielne väzobné a neutralizačné schopnosti voči ľudskému interferonu alfa 1. Antiséra vykazujú aj krížovú reaktivitu s príbuznými subtypmi ľudského interferonu alfa. Pripravu homogénnych protilátok s neutralizačnou a súčasne s väzobnou aktivitou voči ľudskému interferonu alfa 1 umožňuje iba hybridómová technika prípravy monoklonálnych protilátok. Takéto monoklonálne protilátky umožňujú dôkaz prítomnosti ľudského interferonu alfa i v rôznych biologických materiáloch pomocou citlivých neutralizačných a imunochémických stanovení. Hybridómy sa získavajú známym spôsobom opísaným v literatúre [G. Köhler, C. Milstein: Nature, 256 (1975)]. Hybridóm IFNA1-48 nebol doteraz pripravený.

Nevýhody konvenčne pripravených antisér voči ľudskému interferonu alfa i v podstatnej miere odstraňuje vynález, ktorého podstatou je myší hybridóm IFNA1-48, produkujúci monoklonálnu protilátku imunoglobulínovej podtriedy G1 voči rekombinantnému ľudskému interferonu alfa 1. Hybridóm IFNA1-48 je uložený vo Virologickom ústave SAV, Dúbravská cesta, 842 46 Bratislava.

Výhodou hybridómu IFNA1-48 je, že produkuje homogénnu protilátku, ktorá je schopná špecificky neutralizovať a viazať ľudský interferon alfa 1 a nerozoznáva iné subtypy ľudského interferonu alfa. Po rozmrazení bunky hybridómu IFNA1-48 pokračujú v produkcii protilátky i bez ďalšej imunizácie ľudským interferonom alfa 1.

Príklad

Hybridómy sa získajú fúziou myších myelómových buniek NSO a buniek získaných zo sleziny myší kmeňa BALB/c imunizovaných rekombinantným ľudským interferonom alfa 1 (Ernst Boehringer-Institute für Arzneimittelforschung, Viedeň). Po fúzii bol vybratý hybridóm IFNA1-48, ktorý produkuje monoklonálnu protilátku imunoglobulínovej podtriedy G1, selektívne neutralizujúcu a viažúcu ľudský interferon alfa 1. Hybridóm IFNA1-48 sa pestuje in vitro v kultivačných médiách alebo in vivo v peritoneálnej dutine myší kmeňa BALB/c. Bunky sa zmrazujú a uchovávajú v tekutom dusíku a po rozmrazení pokračujú v produkcii protilátky bez ďalšej imunizácie ľudským interferonom alfa 1. Bunky hybridómu IFNA1-48 rastú in vitro ako suspenzná kultúra a produkujú do kultivačného média približne 1 $\mu\text{g/ml}$ špecifickej protilátky. Kultivačným médiom je Dulbeccova modifikácia Eaglovho minimálneho esenciálneho média [R. Dulbecco, G. Freeman: Virology 8, 396 (1959)]. Toto médium je pre kultiváciu hybridómov doplnené inaktivovaným konským sérom (ELAN CLONE). Za účelom získania väčšieho množstva monoklonálnej protilátky voči ľudskému interferonu alfa 1 sa bunky IFNA1-48 aplikovali v množstve $5 \cdot 10^6$ do peritoneálnej dutiny myši BALB/c. Myš sa desať dní pred touto aplikáci-

ciou premedikuje parafínovým olejom (0,5 ml intraperitoneálne na myš). Po 10 až 15 dňoch od injekcie buniek IFNA1-48 bola myši odobratá ascitická tekutina, ktorá obsahovala požadovanú monoklonálnu protilátku v koncentrácii 1,1 mg/ml.

Myší hybridóm IFNA1-48 sa používa ako zdroj homogénnej protilátky imunoglobulínovej podtriedy G1, ktorá špecificky viaže a neutralizuje ľudský interferon alfa 1, pričom nereaguje s inými subtypmi ľudského interferonu alfa. Pripravená protilátka sa používa na detekciu ľudského interferonu alfa i v biologických (neutralizačných) a imunochemických (RIA, ELISA, imunoblot) testoch. Protilátka je vhodná aj na imunoafinitnú purifikáciu ľudského interferonu alfa 1.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

Myší hybridóm IFNA1-48 produkujúci monoklonálnu protilátku imunoglobulínovej podtriedy G1 voči rekombinantnému ľudskému interferonu alfa 1.

Konec dokumentu
