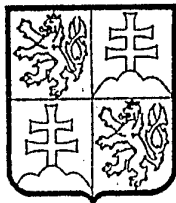


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS 276 203

(11) Číslo dokumentu :

(21) Číslo přihlášky : 5110-90.A

(22) Přihlášeno : 22 10 90

(30) Prioritní data :

(13) Druh dokumentu : B6

(51) Int. Cl.⁵ :

C 12 N 5/18

(40) Zveřejněno : 15 04 92

(47) Uděleno : 21 02 92

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 15 04 92

(73) Majitel patentu : VIROLOGICKÝ ÚSTAV SAV, BRATISLAVA

(72) Původce vynálezu : KONTSEK PETER RNDr. CSc., SENEC,
NOVÁK MICHAL MVDr. CSc., BRATISLAVA,
KONTSEKOVÁ EVA RNDr., SENEC,
BORECKÝ LADISLAV akademik, BRATISLAVA

(54) Název vynálezu : Myší hybridóm IFNA2-N10 produkující monoklonální
protilátku viažúcu ľudský interferon alfa 2

(57) Anotace :

Účelom riešenia je príprava novej homogénnej protilátky, ktorá sa viaže s ľudským interferonom alfa 2 a neviaže sa s inými subtypmi ľudského interferonu alfa. Uvedeného účelu sa dosiahne použitím nového myšieho hybridómu IFNA2-N10, produkujúceho monoklonálnu protilátku imunoglobulínovej podtriedy G1 voči rekombinantnému ľudskému interferonu alfa 2. Myší hybridóm IFNA2-N10 má použitie v imunodiagnostike a pri čistení ľudského interferonu alfa 2.

Vynález sa týka nového myšieho hybridómu IFNA2-N10 produkujúceho monoklonálnu protilátku, ktorá sa viaže s ľudským interferonom alfa 2.

Protilátky voči ľudskému interferonu alfa 2 sa pripravujú vo forme antisér alebo monoklonálnych protilátok. Antiséra sa získavajú imunizáciou pokusných zvierat purifikovaným antigénom (ľudským interferonom alfa 2). Takto pripravené protilátky sú neštandardné a sú vždy zmesou protilátok s väzobnými a s neutralizačnými schopnosťami voči ľudskému interferonu alfa 2. Antiséra vykazujú aj krížovú reaktivitu s príbuznými subtypmi ľudského interferonu alfa. Prípravu homogénnych protilátok s výlučne väzobnou aktivitou voči ľudskému interferonu alfa 2 umožňuje iba hybridómová technika prípravy monoklonálnych protilátok. Takéto monoklonálne protilátky umožňujú dôkaz prítomnosti ľudského interferonu alfa 2 v rôznych biologických materiáloch pomocou citlivých imunochemických stanovení. Hybridómy sa získavajú známym spôsobom opísaným v literatúre /G. Köhler, C. Milstein: Nature, 256 (1975)/. Hybridóm IFNA2-N10 nebol doteraz pripravený.

Nevýhody konvenčne pripravených antisér voči ľudskému interferonu alfa 2 v podstatnej miere odstraňuje vynález, ktorého podstatou je myší hybridóm IFNA2-N10, produkujúci monoklonálnu protilátku imunoglobulínovej podtriedy G1, ktorá má schopnosť špecificky reagovať s rekombinantným ľudským interferonom alfa 2. Hybridóm IFNA2-N10 je uložený vo Virologickom ústave SAV, Dúbravská cesta 9, 842 46 Bratislava.

Výhodou hybridómu IFNA2-N10 je, že produkuje homogénnu protilátku, ktorá je schopná špecificky reagovať iba s ľudským interferonom alfa 2 a nerozoznáva iné subtypy ľudského interferonu alfa. Po rozmrazení bunky hybridómu IFNA2-N10 pokračujú v produkcii protilátky i bez ďalšej imunizácie ľudským interferonom alfa 2.

Príklad 1

Hybridómy sa získajú fúziou myších myelómových buniek NS0 a buniek získaných zo sleziny myši kmeňa BALB/c imunizovaných rekombinantným ľudským interferonom alfa 2c (Ernst-Boehringer-Institut für Arzneimittelforschung, Viedeň). Po fúzii bol vybratý hybridóm IFNA2-N10, ktorý produkuje monoklonálnu protilátku imunoglobulínovej podtriedy G1, selektívne sa viažucu s ľudským interferonom alfa 2. Hybridóm IFNA2-N10 sa pestuje in vitro v kultivačných médiách alebo in vivo v peritoneálnej dutine myši kmeňa BALB/c. Bunky sa zmrazujú a uchovávaajú v kvapalnom dusíku a po rozmrazení pokračujú v produkcii protilátky bez ďalšej imunizácie ľudským interferonom alfa 2. Bunky hybridómu IFNA2-N10 rastú in vitro ako suspenzná kultúra a produkujú do kultivačného média približne 1 ug/ml špecifickej protilátky. Kultivačným médium je Dulbeccova modifikácia Eagleovho 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 proti ľudskému interferonu alfa 2 sa bunky IFNA2-N10 aplikovali v množstve $5 \cdot 10^6$ do peritoneálnej dutiny myši BALB/c. Myš sa desať dní pred touto aplikáciou premedikuje parafínovým olejom (0,5 ml intraperitoneálne na myš). Po 10 až 15 dňoch od injekcie buniek IFNA2-N10 bola myši odobratá ascitická tekutina, ktorá obsahuje požadovanú monoklonálnu protilátku v koncentrácii približne 1 mg/ml.

Myší hybridóm IFNA2-N10 sa používa ako zdroj homogénnej protilátky imunoglobulínovej podtriedy G1, ktorá selektívne viaže ale neneutralizuje ľudský interferon alfa 2, pričom nereaguje s inými subtypmi ľudského interferonu alfa. Pripravená protilátka sa používa na detekciu ľudského interferonu alfa 2 v imunochemických testoch ELISA, RIA, imunoblot a v imunochemistochémii. Protilátka je vhodná aj na imunoafinitnú purifikáciu ľudského interferonu alfa 2.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

Myší hybridóm IFNA2-N10 produkujúci monoklonálnu protilátku podtriedy IgG1 voči rekombinantnému ľudskému interferonu alfa 2.