



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

267 394

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 5/00

(21) PV 5268-88.F
(22) Prihlášené 22 07 88

(40) Zverejnené 13 06 89
(45) Vydané 14 12 90

(75)
Autor vynálezu

KONTSEK PETER RNDr. CSc., SENEC, BORECKÝ LADISLAV akademik,
BRATISLAVA, KONTSEKOVÁ EVA RNDr., SENEC,
NOVÁK MICHAL MVDr. CSc., BRATISLAVA

(54)

Myší lymfocytárny hybridóm VÚ IFN BBA6

(57) Riešenie sa týka myšieho lymfocytárneho hybridómu produkujúceho širokospektrálnu protilátku voči ľudskému a myšiemu fibroblastovému interferónu beta a proti ľudskému rekombinantnému interferónu alfa 2, uloženého v zbierke hybridómov Virologického ústavu SAV v Bratislave pod označením VÚ IFN BBA6. Monoklonálna protilátka hybridómu VÚ IFN BBA6 je vhodná na stanovenie prítomnosti uvedených typov interferónov na základe inhibície ich biologickej aktivity v interferón-neutralizačných testoch alebo na základe špecifickej väzobnej reakcie v imunoenzymatických testoch. Je vhodná aj na účely preparatívne pre čistenie ľudského a myšieho interferónu beta a ľudského interferónu alfa 2 metódou imunoafinitnej chromatografie. Monoklonálnu protilátku možno využiť aj na prípravu sér špecifických k myšiemu imunoglobulínu podtriedy IgG2a.

Vynález sa týka nového hybridómu, t. j. hybridného jednobunkového organizmu, zostrojeného bunkovou fúziou myšej myelómovej línie NSO a myšej slezinovej lymfoidnej bunky, produkujúcej širokospektrálnu protilátku proti ľudskému interferónu beta, myšiemu interferónu beta a ľudskému interferónu alfa 2.

Doposiaľ sa protilátky voči interferónom vyrábajú tak, že sú jednotlivé typy interferónov opakovane injikované ako antigén pokusným zvieratám, najčastejšie králikom alebo ovciam. Sérum takto imunizovaných zvierat, odobrané po určitej dobe pôsobenia antigénu, slúži ako zdroj protilátok, používaných predovšetkým pre kvantitatívnu alebo kvalitatívnu analýzu antigénu — jednotlivých interferónov — vo výskume a v imunodiagnostickej praxi. Tento postup, nazývaný konvenčnou imunizáciou, má niekoľko nevýhod. V sére imunizovaných zvierat sa nachádza heterogénna zmes protilátok, ktorých spektrum je v každom jednotlivom organizme rôzne a neopakovateľné. Organizmus spravidla vytvorí okrem protilátok voči žiadanému antigénu i protilátky voči nečistotám antigénového preparátu, ktoré je potrebné zo sér odstraňovať vysycovaním. Výrobné šarže konvenčných sér sa preto dajú ťažko štandardizovať a bývajú v širokom rozmedzí kvality. Pre výrobu každej šarže treba pripraviť čistý imunizačný antigén a ďalšie antigény na vysýtenie balastných protilátok proti nečistotám.

Uvedené nedostatky vyššie zmieneného a doposiaľ používaného postupu odpadnú, ak je k dispozícii hybridóm, produkujúci monoklonálnu širokospektrálnu protilátku voči ľudským interferónom beta, alfa 2 a voči myšiemu interferónu beta uložený v zbierke hybridómov Virologického ústavu SAV v Bratislave, Mlynská dolina 1, pod označením VÚ IFN BBA6.

Uvedený hybridóm bol získaný spôsobom známym z odbornej literatúry (Köhler, G., Milstein, C.: Continuous cultures of fuse cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, /1975/, 495; Gerhard, W.: Fusion of cells in suspension and outgrowth of hybrids in conditioned medium. In: *Monoclonal antibodies. Hybrids: A New Dimension in Biological Analyses*. R. H. Kennet, T. J. McKearn, K. B. Bechtol, eds., New York, Plenum Press, /1980/, 370) klonovaním súboru hybridných buniek po fúzii myšej myelómovej línie NSO a buniek, získaných zo sleziny myši kmeňa BALB/c, imunizovaných preparátom ľudského interferónu beta.

Výhodou hybridómu je, že produkuje homogénnu protilátku, tzv. monoklonálnu protilátku, ktorá je schopná špecificky reagovať s ľudskými interferónmi beta, alfa 2 alebo s myším interferónom beta. Hybridóm VÚ IFN BBA6

možno kultivovať in vitro v médiách vhodných pre živočíšne bunky, alebo in vivo v peritoneálnej dutine myši kmeňa BALB/c. Z konzerv, uchovaných v kvapalnom dusíku, možno zahájiť produkciu protilátky bez ďalšej imunizácie antigénom.

Príklad

Pre účel pomnoženia hybridómových buniek in vivo sa aplikovalo 5×10^6 buniek do peritoneálnej dutiny myši. Pre lepšie uchytenie aplikovaných buniek bola myš 15 dní pred prenosom buniek hybridómu premedikovaná parafinovým olejom (0,5 ml intraperitoneálne). Po 20 dňoch rastu hybridómu v peritoneálnej dutine bola myš zabitá a vyprodukovaná ascitická tekutina odobratá. Celkom sa získalo 7 ml ascitickej tekutiny, ktorá obsahovala 8 mg/ml imunoglobulínu. Ascitická tekutina, obsahujúca produkt hybridómu VÚ IFN BBA6 špecificky inhibovala antivírusovú a antiproliferatívnu aktivitu ľudského fibroblastového interferónu beta, myšieho fibroblastového interferónu beta a ľudského rekombinantného interferónu alfa 2. Monoklonálna protilátka vykazovala aj špecifickú väzbu s jednotlivými interferónmi v imunoenzymatických testoch.

In vitro rastú hybridómy ako polosuspenná kultúra. Majú tvar (guľatý) a veľkosť charakteristické pre myelómové bunky, obsahujú fúzané bunkové jadrá, sú aneuploidné. Bunky hybridómu VÚ IFN BBA6 majú ultraštruktúrny obraz typických myelómových buniek, kde prevažujúcou organelou sú voľné a na membrány viazané polyribozómy. Základným kultivačným médiom je Dulbeccova modifikácia Eaglovho minimálneho esenciálneho média (Dulbecco, R. a Freeman, G., *Virology* 8 /1959/, 396). Toto médium, označované ako DMEM, je pre kultiváciu hybridómu doplnené gentamycínom a inaktivovaným konským sérom (10 %, Elan clone, Bratislava). Hybridóm je kultivovaný pri 37 °C — jeho stredná generačná doba je približne 24 hod. Produkovaná protilátka je monoklonálny imunoglobulín podtriedy IgG2a.

Hybridóm VÚ IFN BBA6 môže byť priemyslovo využívaný ako zdroj širokospektrálnej protilátky voči ľudskému a myšiemu fibroblastovému interferónu beta a proti ľudskému rekombinantnému interferónu alfa 2 pri kvantitatívnom alebo kvalitatívnom vyhodnocovaní prítomnosti jednotlivých typov interferónov vo vyšetrovanom materiáli. Monoklonálnu protilátku je možné využiť aj pri purifikácii jednotlivých typov interferónov v imunoafinitnej chromatografii alebo ako zdroj protilátky jedinej podtriedy (IgG2a) pre prípravu sér špecifických pre uvedenú podtriedu.

PREDMET VYNÁLEZU

Myši lymfocytárny hybridóm VÚ IFN BBA6 produkujúci širokospektrálnu monoklonálnu protilátku podtriedy IgG2a proti ľudskému

a myšiemu fibroblastovému interferónu beta a voči ľudskému rekombinantnému interferónu alfa 2.