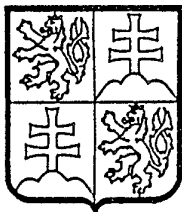


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS 276 080

(11) Číslo dokumentu :

(21) Číslo přihlášky : 4759-90. X

(22) Přihlášeno : 01 10 90

(30) Prioritní data :

(13) Druh dokumentu : B6

(51) Int. Cl.⁵ :

C 12 N 5/20

(40) Zveřejněno : 18 03 92

(47) Uděleno : 22 01 92

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 18 03 92

(73) Majitel patentu : VIROLOGICKÝ ÚSTAV SAV, BRATISLAVA

(72) Původce vynálezu : KONTSEKOVÁ EVA RNDr., SENEC,
NOVÁK MICHAL MVDr. CSc., BRATISLAVA

(54) Název vynálezu : Myší hybridom HRP 16-1 produkující monoklonální
protilátku imunoglobulinové podtřídy G2a
voči chrenovej peroxidáze

(57) Anotace :

Účelom riešenia je príprava novej idioty-
povo homogénnej protilátky rozpoznávajú-
cej chrenovú peroxidázu. Uvedeného účelu
sa dosiahne použitím nového myšieho hybri-
dómu HRP 16-1 produkujúceho monoklonálnu
protilátku podtřídy IgG2a voči chrenovej
peroxidáze. Myší hybridom HRP 16-1 má po-
užitie v imunodiagnostike.

Vynález sa týka nového myšieho hybridómu HRP 16-1 produkujúceho monoklonálnu protilátku imunoglobulínovej podtriedy G2a voči chrenovej peroxidáze.

Do objavenia hybridómovej technológie prípravy monoklonálnych protilátok sa protilátky (antiséra) proti chrenovej peroxidáze pripravovali imunizáciou pokusných zvierat, najčastejšie oviec a králikov. Sérum takto imunizovaných zvierat odobrané po viacerých dávkach antigénu slúžilo ako zdroj špecifických protilátok. Tieto sa používali pri tvorbe komplexov peroxidáza - anti-peroxidáza, ktoré umožňujú vysoko citlivé a špecifické imunochémické stanovenia. Keďže takto pripravené anti-peroxidázové protilátky boli neštandardné a titer špecifických protilátok bol nízky, začali sa používať ako zdroj protilátok hybridómy produkujúce monoklonálne protilátky proti chrenovej peroxidáze. Hybridómy sa získavajú známym spôsobom opísaným v literatúre [G. Köhler, C. Milstein.: Nature, 256 (1975)]. Hybridóm HRP 16-1 nebol ešte pripravený.

Nevýhody konvenčne pripravených antisér voči chrenovej peroxidáze v podstatnej miere odstraňuje vynález, ktorého podstatou je myši hybridóm HRP 16-1, produkujúci monoklonálnu protilátku imunoglobulínovej podtriedy G2a, ktorá má schopnosť špecificky reagovať s chrenovou peroxidázou. Hybridóm HRP 16-1 je uložený vo Virologickom ústave SAV, Dúbravská cesta 9, 842 46 Bratislava.

Výhodou tohto hybridómu je, že produkuje homogénnu protilátku, ktorá je schopná špecificky reagovať s chrenovou peroxidázou a po rozmrazení bunky HRP 16-1 pokračujú v produkcii protilátky i bez ďalšej imunizácie chrenovou peroxidázou.

Príklad

Hybridóm HRP 16-1 sa získava fúziou myších myelómových buniek NSO a buniek získaných zo sleziny myši kmeňa BALB/c imunizovaných chrenovou peroxidázou (Horse radish peroxidase, Grad I, Boehringer GmbH, Mannheim, SRN). Hybridóm HRP 16-1 sa pestuje in vitro v kultivačných médiach alebo in vivo v peritoneálnej dutine myši kmeňa BALB/c. Bunky sa zmrazuju a uchovávajú v kvapalnom dusíku a po rozmrazení pokračujú v produkcii protilátky bez ďalšej imunizácie chrenovou peroxidázou. Bunky hybridómu HRP 16-1 rastú in vitro ako suspenzná kultúra a produkujú do kultivačného média približne 1 μ g/ml špecifickej protilátky. Kultivačným médiom je Dulbeccova modifikácia Eagleovho minimálneho esenciálneho média [R. Dulbecco, G. Freeman, Virology 8, 396 (1959)]. Toto médium je pre kultiváciu hybridómov doplnené inaktivovaným koňským sérom (ELAN CLONE). Za účelom získania väčšieho množstva monoklonálnej protilátky proti chrenovej peroxidáze sa bunky HRP 16-1 aplikovali v množstve $5 \cdot 10^6$ do peritoneálnej dutiny myši BALB/c. Myš bola desať dní pred touto aplikáciou premedikovaná parafínovým olejom (0,5 ml intraperitoneálne na myš). Po 10 až 15 dňoch od injekcie buniek HRP 16-1 bola myš odobratá ascitická tekutina, ktorá obsahuje požadovanú monoklonálnu protilátku v koncentrácii približne 1 mg/ml.

Myši hybridóm HRP 16-1 sa používa ako zdroj homogénnej protilátky imunoglobulínovej podtriedy G2a voči chrenovej peroxidáze. Pripravená protilátka sa používa v komplexe peroxidáza - anti-peroxidáza pri ELISA teste, imunoblote a imunohistochemii. Ďalej má hybridóm HRP 16-1 použitie pri príprave bišpecifických monoklonálnych protilátok, ktoré zvyšujú citlivosť imunodetekčných testov.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

Myši hybridóm HRP 16-1 produkujúci monoklonálnu protilátku podtriedy IgG2a voči chrenovej peroxidáze.