

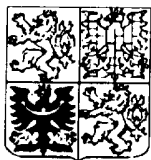
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

280 894

ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **3014-92**

(22) Přihlášeno: 02. 10. 92

(40) Zveřejněno: 17. 05. 95

(47) Uděleno: 12. 03. 96

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 15. 05. 96

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N 15/48

C 12 N 15/85

C 12 N 15/20

C 12 N 15/18

(73) Majitel patentu:

Výzkumný ústav veterinárního lékařství,
Brno, CZ;

(72) Původce vynálezu:

Rodák Ladislav MVDr. CSc., Brno, CZ;

Granátová Marta RNDr., Brno, CZ;

Nevoránková Zora MVDr., Brno, CZ;

Veselý Tomáš Ing., Brno, CZ;

(54) Název vynálezu:

Myší lymfocytární hybridom BLV-01

(57) Anotace:

Myší lymfocytární hybridom BLV-01, který produkuje monoklonální protilátku proti p 24 viru enzootické bovinní leukózy. Monoklonální protilátka reaguje specificky s původcem onemocnění při ELISA vyšetření. Při Western blot analýze reaguje monoklonální protilátka specificky s virovým proteinem p 24. Přípravená monoklonální protilátka je použitelná k vysoce citlivé a specifické diagnostice onemocnění.

CZ 280 894 B6

Myší lymfocytární hybridom BLV-01

Oblast techniky

Předmětem vynálezu je myší lymfocytární hybridom BLV-01, použitelný ve veterinárním lékařství k vysoce citlivé a specifické diagnostice bovinní leukózy.

Dosavadní stav techniky

Virus bovinní leukózy (BLV) je retrovirus, vyvolávající enzootickou bovinní leukózu - lymfosarkomatózu, kteréžto onemocnění je rozšířené po celém světě. Infikovaná zvířata je možno diagnostikovat a izolovat ještě před objevením klinických příznaků, jako zduření mizních uzlin, lymfocytózy, snížení užitkovosti a dalších, průkazem specifických antivirových protilátek v krevním séru. Tyto protilátky, které jsou u infikovaných zvířat zjistitelné v závislosti na citlivosti diagnostické metody již během několika týdnů po infekci, jsou vytvářeny zejména proti dvěma hlavním virovým antigenům: glykoproteinu gp 51 kD a proteinu p 24 kD.

K diagnostice onemocnění a ozdravování chovů skotu od BLV je široce používán imunodifuzní test. Tato metoda je poměrně citlivá a specifická, avšak není dostatečně citlivá ke stanovení nízkých koncentrací antivirových protilátek v krvi čerstvě infikovaných zvířat a stejně tak není schopna stanovit tyto protilátky ve směsných vzorcích krve, odebraných na jatkách, nebo ve vzorcích mléka, individuálních nebo směsných, odebraných na farmách. Tyto požadavky na vyšší citlivost, včetně vysoké specifity, splňují diagnostické metody ELISA. Podle doporučení Mezinárodní epizootologické organizace (OIE) v Paříži by komerčně vyráběné ELISA diagnostické soupravy měly splňovat požadavky na citlivost stanovení anti-BLV protilátek tak, že jako pozitivní musí být hodnocen konečný vzorek krevních sér - směs jednoho objemového dílu referenčního pozitivního séra a 49 objemových dílů negativního séra. Stejně přísné jsou požadavky na hodnocení směsných vzorků hovězího mléka.

Při přípravě ELISA souprav k diagnostice BLV protilátek jsou na stěny jamek mikrotitračních ploten navázány virové antigeny (BLV). Vyšetřovaná hovězí séra s těmito antigeny během první inkubace reagují a vazba hovězích protilátek na BLV antigeny je prokazována během další inkubace s konjugátem peroxidáza - protilátka proti hovězímu imunoglobulinu a vizualizována po nanesení roztoku substrátu. BLV antigen, použitý pro účely ELISA vyšetření, musí být vysoce purifikovaný, což je časově a finančně nákladné a výrazně snižuje výtěžnost antigenu.

Přesto ani použití vysoce purifikovaného antigenu nezaručuje dosažení dostatečné citlivosti ELISA vyšetření.

Podstata vynálezu

Uvedené nedostatky je možno odstranit použitím hybridomu, produkujícího immunochemicky homogenní protilátky proti specifickému proteinu viru bovinní leukózy podle vynálezu. Myší lymfocy-

tární hybridom BLV-01, produkující monoklonální protilátku proti proteinu p 24 viru enzootické bovinní leukózy skotu, uložený ve Sbírce zoopateogenních mikroorganismů pod označením CAPM-TK 3/92, byl získán způsobem, známým z odborné literatury (Köhler G., MILSTEIN C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature, 256, 1975, s. 495-497; Monoclonal Antibodies; Principles and Practice, J.W. Goding ed., Acad. Press, 1986, s. 315) selekcí a klonováním produkujících hybridomových buněk, vzniklých fúzí myší myelomové linie Sp 2/0 a lymfocytárních buněk, získaných ze sleziny myší kmene BLAB/c, imunizovaných purifikovaným virem BLV.

Výhodou myšího lymfocytárního hybridomu BLV-01 podle vynálezu je, že produkuje monoklonální protilátku, která je imunochemicky a biologicky homogenní a reaguje specificky pouze s antigenem determinantou daného virového proteinu. Produkční hybridomové buňky jsou "nesmrtelné", umožňují produkci monoklonální protilátky v libovolném množství a tím provádění standardní, vysoce specifické a citlivé diagnostiky onemocnění. V porovnání s dosavadním stavem, který reprezentuje imunodifuzní test, představuje využití monoklonálních protilátek v diagnostice onemocnění kvalitativně vyšší stupeň.

Příklad provedení vynálezu

K získání většího množství monoklonálních protilátek se produkující hybridom intraperitoneálně aplikuje BALB/c myším, které byly 7 až 30 dnů předem senzibilizovány intraperitoneální aplikací Pristanu nebo parafinového oleje.

Ascitická tekutina, získaná z břišní dutiny těchto myší, obsahuje vysoké koncentrace monoklonálních protilátek. Jejich kvalita, koncentrace, třída imunoglobulinu, specifita atd. se ověří ELISA stanovením titrů protilátek v ascitické tekutině Western blot analýzou, imunodifuzí v agarovém gelu s použitím třídově specifických antisér proti myším imunoglobulinům. Purifikací se z ascitické tekutiny izolují monoklonální protilátky, které se použijí k vazbě na stěny jamek mikrotitrační plotny pro ELISA vyšetření. Po promytí jamek se jamky naplní roztokem BLV antigenu. Během inkubace dochází k reakci monoklonální protilátky BLV antigen p 24 a k vazbě tohoto specifického virového antigenu na stěny jamek mikrotitrační plotny. Takto připravené plotny pro ELISA vyšetření, využívající monoklonální protilátku k vazbě specifického antigenu (monoclonal antibody-antigen capture ELISA), se vyznačují podstatně vyšší citlivostí i specifitou ve srovnání s přímou vazbou antigenu na stěny jamek. Výsledky dosažené při ELISA vyšetření pozitivních, limitních a negativních vzorků hovězích krevních sér dokumentuje podstatné zvýšení citlivosti metody s použitím monoklonálních protilátek (viz tabulka č. 1).

Průmyslová využitelnost

Monoklonální protilátky jsou využitelné při purifikaci virových antigenů pomocí afinitní chromatografie, analýze strukturálních proteinů virů atd. Největší možnosti využití existují při výrobě komerčních diagnostických souprav, uplatnitelných na domácím i zahraničním trhu.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

Myší lymfocytární hybridom BLV-01, produkující monoklonální protilátku proti proteinu p 24 viru enzootické bovinní leukózy skotu, uložený ve Sbírce zoopatogenních mikroorganismů pod označením CAPM-TK 3/92.

Konec dokumentu
