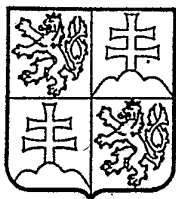


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

273 452

(21) PV 5558-88.0
(22) Přihlášeno 10 08 88

(40) Zveřejněno 12 07 90
(45) Vydáno 10 02 92

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵
G 01 N 33/53

(75) Autor vynálezu KOŘÍNEK JAROSLAV ing., HACHOVÁ LUBĚNA ing.,
TADRA MILOŠ, PRAHA

(54) Způsob výroby čistých specifických protilátek k rychlému
kvantitativnímu stanovení koncentrace bílkovin

(57) Způsob výroby k získání výběrových souborů protilátkových molekul s vysokou čistotou a specifitou, univerzálně použitelný pro celou řadu protilátek proti bílkovinám normálním i patologickým podle druhu vstupních materiálů. Na lidské sérum normální nebo patologické nebo na 10% vodný roztok lyofilizovaných bílkovin močových nebo jiných se působí v rozmezí pH 8,0 až 9,0 jednou setinou až jednou desetinou objemu 25% vodného roztoku glutaraldehydu při 18 až 28 °C 1 až 3 hodiny, ke směsi se přidá 1/20 až 1/5 objemu 10% vodného roztoku síranu hlinitodraselného, vzniklé vločky se izolují a promyjí vodovodní vodou. Poté se ponoří do trojnásobného až desetinásobného objemu specifického hyperimunního séra. Po 1 až 3 dnech sledování poklesu protilátek v tekutině nad vločkami se vločky promyjí vodovodní vodou a eluují se v 0,2M vodném roztoku kyseliny octové s 2 % sacharózy. Eluát se upraví do neutrální reakce koncentrováním vodným roztokem amoniaku a protilátky se srazí rozpuštěním 350 g pevného síranu amonného na litr eluátu. Po 16 hodinách stání při +5 °C se čirý supernatant dekantuje a sražená protilátka se rozpustí v 0,15M vodném roztoku chloridu sodného, dialyzuje se a lyofilizuje. Získaný produkt je vhodný všude tam, kde se požaduje vysoká citlivost a rychlost při stanovení bílkovin normálních i patologických, například v metodách imunofluorescenčních, imunoadhezenčních, nefelometrických a konjugačních. V metodách imunoprecipitačních eliminuje např. vypírání bílkovin z agarového gelu, protože neruší balastní proteinové pozadí v reakcích.

Vynález řeší na bázi polymerace bílkovin glutaraldehydem způsob výroby široké palety diagnostických protilátek k rychlému stanovení koncentrace bílkovin, technicky a ekonomicky vhodný k výrobě čistých specifických protilátek v průmyslovém měřítku.

Dosud nejvyšší precizita diagnostické protilátky produkuje firma Dakopatts, Dánsko, v podobě purifikovaného imunoglobulinu s relativně vysokými titry protilátek. Většina ostatních světových výrobců vyrábí obdobná diagnostika v podobě jen částečně purifikovaných imunoglobulinů, nebo jen různým způsobem stabilizovaná zvířecí séra s obsahem specifických protilátek. Přidružené balasty neúčinných bílkovin snižují výrazně hodnotu diagnostika v citlivosti průkazu i rozsahu použití. Toto omezení je výrazné jen zčásti u špičkových produktů firmy Dakopatts, avšak i zde je převážná část imunoglobulinů neúčinná, tj. protilátkově neaktivní. Navíc je purifikace těchto imunoglobulinů pracovně a ekonomicky pro výrobce nevýhodná, protože vyžaduje opakovanou přesrážení zvířecího séra síranem amonným při značném objemovém nárůstu. Centrifugace velkých objemů je energeticky náročná a také dochází ke ztrátám imunoglobulinu v dalších fázích purifikace na iontoměničích, které jsou pro dočištění produktu nezbytné. Nejzávažnějším nedostatkem je, že k dosažení konkurenceschopného produktu je nutno expedovat purifikovaný imunoglobulin mnohdy až v 5 a 10% vodném roztoku, přičemž obsah účinné protilátky, která je jen částí úhrnného IgG, je vlastně jen zlomkový. Preparace specifických protilátek v čistém stavu technikami afinitní chromatografie je sice teoreticky známa a technicky dobře zpracována, ale její nevýhodou je použitelnost spíše jen v měřítku laboratorním. Rozšíření výroby v měřítku průmyslovém brání technická náročnost, pracnost a vysoké náklady spojené s používáním dosti drahých sorbentů, purifikací navázaných imunogénů, uvolňování protilátek elucí v čistém stavu a řada dalších technologických úkonů. Důkazem toho je skutečnost, že preparáty specifických protilátek jsou na světovém trhu jen omezeně dostupné, některé v podobě monoklonálních protilátek, jejichž využití je například v technikách imunoadherenčních ne však v technikách imunoprecipitačních.

Předmětem vynálezu je způsob výroby čistých specifických protilátek určených k rychlému kvantitativnímu stanovení koncentrace bílkovin, založený na principu polymerace bílkovin glutaraldehydem. Postup je vyznačen tím, že na lidské sérum normální, nebo patologické, nebo na 10% vodný roztok lyofilizovaných bílkovin močových, nebo jiných, se působí v rozmezí pH 8,0 až 9,0 jednou setinou až jednou desetinou objemu 25% vodného roztoku glutaraldehydu při 18 až 28 °C po dobu jedné až tří hodin, ke směsi se přidá jedna pětina objemu 10% vodného roztoku síranu hlinítodraselného, vzniklé vločky se promyjí, a na síť se přenesou do troj- až desetinasobného objemu specifického hyperimunního zvířecího séra, případně do 0,01 až 10% vodného roztoku zvířecích protilátek. V době jednoho až tří dnů se na vločky vyváží protilátky, přičemž pokles protilátek se sleduje imunochemickými metodami. Potom se vločky promyjí vodovodní vodou, eluují se v 0,2M vodném roztoku kyseliny octové s 2 % sacharózy, eluát se upraví vodným koncentrovaným roztokem amoniaku na pH 6,5 až 7,5 a získaný roztok protilátky, která je prakticky již v čistém stavu, se srazí přidávkou 350 gramů síranu amonného na litr eluční kapaliny, sraženina se ponechá ustát a po dekantaci čirého supernatantu se sraženina rozpustí v 0,15M vodném roztoku chloridu sodného, dialyzuje se a lyofilizuje.

Novost vynálezu spočívá v tom, že jednotným pracovním postupem (a to bez použití speciálních sorbentů s vázanými izolovanými bílkovinami) umožňuje efektivní výrobu široké palety nejrozličnějších specifických diagnostických protilátek v průmyslovém měřítku, normálních i patologických podle výchozího materiálu použitého k výrobě. Nejvhodnějším materiálem je odpadní (tzv. sběrové) lidské sérum, lze však použít i plazmu, nebo nejrozličnější 10% vodné roztoky lyofilizovaných bílkovin. Požaduje-li se výroba specifických čistých protilátek proti bílkovině patologické, například myelomové, je vstupním materiálem sérum patologické, například myelomové, sérum se zvýšeným obsahem beta-2 mikroglobulinu získané plazmaferézou, případně i směs séra s 10 % lyofilizátu moče obsahující požadovanou patologickou složku. V průběhu pracovního procesu vznikají účinkem síranu hlinítodra-

selného na polymerovanou bílkovinu vločky s příznivými vlastnostmi, které jsou mnohonásobně opakovaně použitelné k vychytání protilátek z hyperimunního zvířecího séra obsahujícího specifickou protilátku proti požadované bílkovině. Eluční systém je volen co nejvýhodněji k dosažení co nejvyšších výtěžků čisté protilátky, která je dostatečně stabilní pro komerční využití. Výtěžek čisté protilátky se pohybuje podle druhu hyperimunního séra v rozmezí 75 až 85 % veškeré protilátky obsažené v hyperimunním séru. Zvýšený účinek vynálezu spočívá v příznivé ekonomické efektivnosti výroby, z velkých objemů hyperimunního séra se zkoncentrují specifické protilátky na relativně malý objem pouhou dekantací, a zároveň odpadá nutnost použití drahých dovozových sorbentů. Centrifugace se pak již omezuje jen na hustou suspenzi síranové sraženiny po dekantaci supernatantu. Vynález byl prozkoušen na více než patnácti druzích specifických hyperimunních sér: alfa-1 antitrypsin, orosomukoid, transferrin, hemopexin, IgG, IgA, Ig komplexní, Gc globulin, alfa-2 I globulin, F ab fragment, prealbumin, C 3 globulin, a další. Výhody čistých protilátek se projevují všude tam, kde se požaduje citlivé a rychlé stanovení bílkovin bez rušivého pozadí způsobeného bílkovinnými balasty, tedy v metodách imunofluorescenčních, nefelometrických, imunoadherenčních, konjugačních, atd. V raketkové technice podle Laurella a v jednoduché radiální imunodifúzi odpadá vypírání agarového gelu, vzhledem k nízké koncentraci bílkovin v gelu. K novosti a vysokému účinku vynálezu lze připsat již i skutečnost, že preparáty této kvality nejsou na světovém trhu běžně dostupné, protože izolace čistých protilátek je v laboratorním měřítku již řadu let využívána. Výrobní náklady při použití uvedeného postupu jsou srovnatelné nebo i nižší, než náklady vynakládané k průmyslové produkci diagnostik typu purifikovaného IgG, přitom však preparáty vyrobené podle vynálezu předstihují světovou špičku, například Dako. Další rozsáhlou možností spojenou s realizací výroby čistých specifických protilátek podle vynálezu je příprava čistých imunogénů pro výrobu specifických zvířecích antisér. Disociací imunoprecipitátů lze získat imunogény v čistém stavu, což umožňuje eliminovat nákladné a často velmi obtížné postupy izolace a purifikace imunogénů z lidské plazmy a jiných biologických materiálů. Bylo by tak možno snížit výrobní náklady spojené s produkcí specifických hyperimunních sér, a nahradit dosavadní technologie výhodným a jednoduchým postupem.

Příklad 1

Ke 3 litrům smíšeného séra dárců krve bylo postupně přidáno 66 ml 25% vodného roztoku glutaraldehydu a za 3 hodiny stání při 21 °C bylo přilito 600 ml 10% vodného roztoku síranu hlinitodraselného. Směs byla promíchána, vločky zachyceny sítím a v průběhu 24 hodin několikrát promyty nadbytkem vodovodní vody. Vločky byly pak zachyceny sítím a ponořeny do 0,15M vodného roztoku chloridu sodného s 0,1 % azidu sodného.

Příklad 2

K 1 kg vlhkých vloček z příkladu 1 byly přidány 4 litry prasečího hyperimunního séra precipitujícího specificky alfa-1 antitrypsin. Směs byla ponechána při +5 °C 72 hodin, přičemž vločky byly občas rozmíchány a denně sledován pokles alfa-1 antitrypsinových protilátek v tekutině nad vločkami. Poté byly vločky zachyceny sítím, promyty několikrát během 24 hodin vodovodní vodou, a izolovány sítím.

Příklad 3

Promyté vločky z příkladu 2 byly eluovány 2 hodiny dvěma litry 0,2M vodného roztoku kyseliny octové s 2 % sacharózy a eluát neutralizován koncentrovaným vodným roztokem amoniaku na pH 6,5. Eluované vločky byly pak znovu eluovány opět 2 litry elučního roztoku 24 hodin při +5 °C, eluát neutralizován, a přilít k eluátu prvnímu.

Příklad 4

Ke změřenému objemu eluátu z příkladu 3 byl přidán pevný síran amonný v množství

350 g na litr eluátu, rozpuštěn mícháním, a suspenze ponechána při $+5^{\circ}\text{C}$ 16 hodin. Čirý supernatant byl dekantován, hustá sraženina odstředěním zbavena přebytečné kapaliny, rozpuštěna v 0,15M vodném roztoku chloridu sodného, dialyzována v nadbytku 0,15M vodném roztoku chloridu sodného a lyofilizována.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby čistých specifických protilátek k rychlému kvantitativnímu stanovení koncentrace bílkovin na principu polymerace bílkovin glutaraldehydem, vyznačený tím, že na lidské normální nebo patologické sérum nebo na 10% vodný roztok bílkovin močových nebo jiných, se působí v rozmezí pH 8,0 až 9,0 jednou setinou až jednou desetinou objemu 25% vodného roztoku glutaraldehydu při 18 až 28 $^{\circ}\text{C}$ po dobu jedné až tří hodin, ke směsi se přidá jedna dvacetina až jedna pětina objemu 10% vodného roztoku síranu hlinitodraselného, vločky se izolují, promyjí, přenesou se do trojnásobného až desetinásobného objemu zvířecího hyperimunního séra nebo do 0,01% až 10% vodného roztoku protilátek, poté se vločky promyjí, eluují se v 0,2M vodném roztoku kyseliny octové s 2 % sacharózy, eluát se upraví na pH 6,5 až 7,5 koncentrovaným vodným roztokem amoniaku, roztok protilátek se srazí 350 g pevného síranu amonného na litr eluátu, produkt se izoluje, dialyzuje a lyofilizuje.