



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

210897

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 12 11 79
(21) (PV 7699-79)

(40) Zveřejněno 30 06 81

(45) Vydáno 15 09 83

(51) Int. Cl.³
A 61 K 39/395

(75)

Autor vynálezu

RODÁK LADISLAV MVDr. CSc., BRNO

(54) Způsob přípravy třídově specifických antisér proti imunoglobulinům imunoglobulinům tříd IgG skotu a prasat

Způsob přípravy třídově specifických antisér proti imunoglobulinům tříd IgG skotu a prasat použitelných ve veterinární medicíně a imunodiagnostice.

Účelem vynálezu je stanovení účinného a poměrně jednoduchého způsobu přípravy komplexní řady třídově specifických antisér, která dosud nejsou v tomto rozsahu v zemích RVHP vyráběna ani dostupná a přitom jsou velmi nutná ve výzkumu i při rozvoji nových moderních imunodiagnostických metod. Uvedeného účelu se dosáhne tím, že při přípravě antisér je použita vhodná forma antigenu - těžké řetězce imunoglobulinových molekul, v kombinaci s účinným imunizačním postupem, který zajišťuje stálý vzestup precipitační aktivity antisér. Třídová specifita těchto antisér je dosažena jejich jednoduchým vysycením, např. pomocí imunosorbentů s navázanými imunoglobuliny jiných tříd.

Vynálezu může být využito také pro komerční účely v podnicích zabývajících se výrobou biopreparátů a imunodiagnostik.

Předmětem vynálezu je způsob přípravy vysoce avidních precipitačních antisér proti imunoglobulinům tříd IgG skotu a prasat.

Při přípravě monospecifických antisér proti jednotlivým třídám imunoglobulinů je nutné zvířata imunizovat ideálně čistými proteiny, k jejichž izolaci je používána gelová filtrace, iontoměničová chromatografie, isoelektrická fokusace, ultracentrifugace, preparativní elektroforéza, imuno elektroforéza a řada jiných metod. Ani použití těchto postupů však větší nou nezaručuje absolutní čistotu izolovaných imunoglobulinů.

Stopy příměsí vyvolávají tvorbu protilátek s nežádoucí specifitou a vyrobená antiséra vytvářejí precipitační linie nejen s požadovaným, ale i s jinými třídami imunoglobulinů a dalšími vysoce antigenními proteiny, jako jsou například lipoprotein, alfa-2-makroglobulin nebo transferrin. U řady zvířat používaných k produkci antisér, zejména u králíků, je třeba počítat i s tím, že vytvořené protilátky reagují nejen s třídově specifickými antigenními determinanty těžkých řetězců, ale i s determinanty lehkých řetězců, které jsou pro všechny třídy imunoglobulinů společné. Příprava třídově specifických a dostatečně avidních antisér je proto značně náročná po odborné i materiální stránce.

Potřeba třídově specifických antisér ve veterinární medicíně stále vzrůstá s rozvojem nejrozumnějších metod, které jsou používány nejen v imunologickém, bakteriologickém, virologickém, parazitologickém, popřípadě i jiném výzkumu, ale i při praktické diagnostice nejrozumnějších patofyziologických stavů. Tím citelněji se projevuje nedostatek jednoduchého způsobu získávání třídově specifických antisér pro zmíněné účely.

Obtíže spojené se získáváním třídově specifických a avidních antisér proti imunoglobulinovým třídám skotu a prasat, zahrnujícím přípravu ideálně čistých tříd imunoglobulinů jako antigenů k imunizaci zvířat a vlastní imunizaci zvířat, odstraňuje způsob přípravy antisér podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že zvolená zvířata - s výhodou králíci - se podrobí imunizaci specifickými, tj. těžkými řetězci imunoglobulinových molekul tříd IgG nejdříve intradermálně, antigenem v kompletním Freundově adjuvans, a teprve po vytvoření imunitní paměti se imunizují intramuskulárně nebo subkutánně antigenem v inkompletním adjuvans a v solubilní formě. Antiséra získaná vykrvením zvířat 6. až 7. den po poslední imunizaci se vysytí pomocí imunosorbentu s navázaným imunoglobulinem jiné třídy nebo lehkými řetězci imunoglobulinových molekul.

Způsob přípravy antisér podle vynálezu je vhodný k přípravě třídově specifických antisér proti jednotlivým třídám a zejména podtřídám IgG imunoglobulinů, které dosud známým způsobem nelze jednoduše připravit.

Hovězí a prasečí imunoglobuliny tříd IgG k provedení imunizace podle vynálezu se získávají z krevních sér nebo z kolostrální syrovátky. Krevní sérum je zdrojem prasečích imunoglobulinů IgG a hovězích imunoglobulinů IgG2, z kolostrální syrovátky se získávají hovězí imunoglobuliny IgG1. Z těchto médií se imunoglobuliny tříd IgG izolují gelovou filtrací na kolonách Sephadexu G 200 a iontoměničovou chromatografií na DEAE Sephadexu A 50.

Získané roztoky jednotlivých tříd imunoglobulinů se pak podrobí štěpení a postupem podle Franěk, F., Zikán, J. (Collect. Czech. Chem. Commun. 1964, 29, s. 1401) získané těžké řetězce uvedených imunoglobulinů se přímo použijí k imunizaci modifikovaným postupem podle Metzger, J. J., Houdayer, M. (Eur. J. Immunol. 1972, 2, s. 127). Po vysycení antisér lehkými řetězci imunoglobulinových molekul se získají antiséra reagující specificky pouze s imunoglobuliny požadované třídy.

Příklad provedení přípravy antisér

Při přípravě antisér se používají purifikované prasečí a hovězí IgG imunoglobuliny co nejvyšší čistoty, které nesmí obsahovat žádné stopy přítomnosti imunoglobulinů IgA a IgM.

Čistota hovězích IgG2 a prasečích IgG imunoglobulinů, hodnocená jednoduchou radiální imunodifúzí podle Manciniové, se vyžaduje vyšší než 99,9 %. U hovězích IgG1 imunoglobulinů se vyžaduje čistota vyšší než 98 % s co nejnižším obsahem IgG2. Připravené imunoglobuliny nesmí obsahovat žádné stopy přítomnosti imunoglobulinů IgA a IgM. Z těchto prasečích a hovězích imunoglobulinů se připraví těžké řetězce imunoglobulinových molekul.

Při přípravě jednotlivých třídově specifických antisér se dodržuje následující jednotné imunizační schéma, podle následujícího příkladu přípravy králičího třídově specifického antiséra proti hovězímu imunoglobulinu IgG1. Při postupu je třeba dodržet požadavek, aby koncentrace antigenu (těžké řetězce hovězího IgG1) v roztocích použitých při přípravě emulzí pro 2 a 3 imunizaci (0,5 až 1,0 mg/ml) byla několikanásobně vyšší než při první imunizaci (0,05 až 0,1 mg/ml).

Při první imunizaci těžkými řetězci hovězího IgG1 se králík intradermálně injikuje emulzí připravenou smíšením i objemu roztoku antigenu o koncentraci 0,05 až 0,1 mg/ml a 2 objemů kompletního Freundova adjuvans (a 0,2 ml emulze i. d. na 6 míst na hřbetě). Za 1 měsíc následují v desetidenním intervalu 2 a 3 intramuskulární injekce emulze, připravené smíšením i objemu roztoku antigenu o koncentraci (0,5 až 1,0 mg/ml) a 2 objemů inkompletního adjuvans (a 0,5 ml emulze i. m. na 6 míst). 10 až 12 den po 3 imunizaci následují ve třech dnech 4 až 6 injekce roztoků antigenu (2,5, 2,5 a 10 mg IgG1). Z úsporných důvodů je možno pro 4 až 6 imunizaci použít i nerozštěpený IgG1.

Tyto poslední injekce ještě dále zvyšují precipitační aktivitu králičího antiséra. Po vykrvení králíka, které následuje 6 až 7 den po poslední injekci antigenu, se z krve izoluje krevní sérum. Získané antisérum není zatím třídově specifické a reaguje nejen s IgG1, ale také s lehkými řetězci ostatních tříd imunoglobulinů. K odstranění třídově nespecifických protilátek se provede vysycení antiséra pomocí imunosorbentu (CNBr Sepharose 4B, Seva-test-Insolmer), na který je navázán imunoglobulin jiné třídy (např. IgG2, IgM) nebo lehké řetězce Ig molekul. Vysycování se podle potřeby opakuje. Antisérum po vysycení je třídově specifické, reagující pouze se specifickým, tj. těžkým řetězcem molekuly hovězího IgG1.

Podle stejného postupu a při dodržení stejných zásad se provádí příprava třídově specifického králičího antiséra proti prasečímu IgG (hovězímu IgG2). K odstranění třídově nespecifických protilátek se v tomto případě použije imunosorbent s navázaným prasečím IgM nebo lehkými řetězci prasečích Ig molekul (hovězí IgG1, IgM nebo lehké řetězce hovězích Ig).

Předmět vynálezu řeší dílčím způsobem přípravu třídově specifických antisér proti imunoglobulinovým třídám IgG skotu a prasat. Problém byl řešen komplexně a přípravu antisér proti třídám IgM a IgA skotu a prasat řeší čs. AO 210 898.

Požadované vlastnosti třídově specifických antisér proti prasečím a hovězím třídám imunoglobulinů získaných podle vynálezu se dokazují imunoprecipitačními testy v agaru: dvojitou radiální imunodifúzí (Ouchterlony) a imuno elektroforézou. Třídově specifické antisérum proti hovězímu imunoglobulinu IgG1 (IgG2) smí vytvářet precipitační linii pouze s IgG1 (IgG2), ale ne s IgG2 (IgG1), IgM a IgA imunoglobuliny. Při imuno elektroforéze smí toto antisérum vytvářet pouze jedinou precipitační linii, odpovídající svou polohou danému imunoglobulinu. Stejně tak třídově specifické antisérum proti prasečímu IgG smí vytvářet precipitační linii pouze s IgG, ale ne s IgM a IgA.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy třídově specifických vysoce avidních precipitačních antisér proti imunoglobulinovým třídám IgG skotu a prasat, vyznačující se tím, že se produkční zvířata - s výhodou králíci - nejprve intradermálně imunizují těžkými řetězci imunoglobulinových molekul zvolené třídy IgG o koncentraci antigenu 0,05 až 0,1 mg/ml v kompletním Freundově adjuvans, po vytvoření imunitní paměti se dvakrát intramuskulárně imunizují těžkými řetězci imunoglobulinových molekul zvolené třídy IgG o koncentraci antigenu 0,5 až 1,0 mg/ml v inkompletním adjuvans, potom se parenterálně imunizují těžkými řetězci imunoglobulinových molekul zvolené třídy IgG v dávce antigenu 2 až 10 mg v jedné injekční dávce v solubilní formě, potom se produkční zvířata vykrví 6 až 7 den po poslední injekci antigenu a získané antisérum se vysytí pomocí imunosorbentu s navázaným imunoglobulinem odlišné třídy nebo lehkými řetězci imunoglobulinových molekul stejného druhu zvířat.