



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

199 802

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 07 12 77
(21) PV 8161-77

(51) Int. Cl.³ A 61 K 35/16

(40) Zveřejněno 17 09 79
(45) Vydáno 01 11 82

(75)

Autor vynálezu KOŘÍNEK JAROSLAV, PRAHA

(54) Způsob výroby diagnostického séra k průkazu HB_s Ag /hepatitis B povrchového antigenu/
a k produkci HB_s Ab /protilátky/

1

Vynález řeší způsob výroby diagnostického séra vhodného jak k průkazu HB_s Ag imuno-precipitačními metodami /protisměrnou elektroforézou, imunodifuzí/, tak i k produkci protilátky proti HB_s Ag, stanoví konkrétní výrobní podmínky, nutné k vyloučení nežádoucích imunogenů z imunizačního materiálu a k dosažení specifity diagnostika. Vynález uvádí rovněž alternativní zjednodušený výrobní postup pro případ výhradního použití diagnostického séra jen k průkazu HB_s Ag, nikoli k produkci HB_s Ab.

Melartinová a Blumberg /Nature 210, str. 1340, 1966/ získali imunizací králíků lidským HB_s Ag pozitivním sérem králíčího sérum, které po smísení s normální HB_s Ag negativní lidskou plasmou mělo vlastnosti diagnostika, vhodného k průkazu HB_s Ag. Výhodou tohoto základního postupu je jednoduchost v provedení, nevýhodou je nepoužitelnost sér některých imunizovaných zvířat, čímž se výroba prodražuje a je obtížně reprodukovatelnou. Lidské sérum totiž obsahuje převážnou část mnohem silnějších imunogenů, než je HB_s Ag a vzniklé silné nespecifické protilátky se v mnoha případech nepodaří z diagnostika odstranit ani smísením králíčího séra s normální lidskou plasmou v objemovém poměru 1:1. Příčinou této závady jsou jednak lipoproteiny, jednak některé "kritické" imunogeny, t.j. takové, které jsou velmi cizorodé pro imunizovaného zvířecího jedince, přičemž jsou obsaženy jen v nízké až stopové koncentraci v normální lidské plasmě. Vzniklé silné protilátky nelze pak z diagnostika odstranit pro nedostatek vysycovacího materiálu, a to ani tehdy, je-li lidské

plasma přidána k diagnostiku v nadbytku. V současné době jsou proto k výrobě HB_sAg diagnostika používány složité několikastupňové výrobní postupy, jejichž nejdůležitější fází je purifikace HB_sAg, sestávající z ultracentrifugace séra v hustotním gradientu po dobu 24 hodin, mající odstranit zejména lipoproteiny. Následují pak další purifikační operace, zpravidla chromatografické, potom imunizace produkčních zvířat /morčat, králíků, koní, ovci a pod./. Imunochemická čistota HB_sAg bývá navzdory purifikačním snahám spíše jen ideálem, takže posledním výrobním stupněm obvykle bývá vysycení nespecifických protilátek HB_sAg negativním lidským sérem, nebo jeho frakcemi. Nevýhodou těchto moderních způsobů oproti postupu klasickému je složitost, nákladnost a omezená výrobní kapacita, uvažíme-li nutnost centrifugace /ultracentrifuga/ po dobu 24 hodin. Vyrobené diagnostické sérum se používá buď přímo v metodách průkazu HB_sAg, nebo slouží jako výchozí surovina k výrobě HB_sAb, t.j. protilátky proti HB_sAg. Tato protilátka je zpravidla komerčně využívána v soupravách, vhodných k citlivému průkazu HB_sAg, vázána enzymem s krvinkami, radioaktivním jódem, fluoresceinisocyanátem a pod., v metodách "třetí generace". Ve všech uvedených případech je základem výroby diagnostické sérum, přesně specificky reagující s HB_sAg.

Podstatou vynálezu je srážecí účinek chlortetracyklinu v přítomnosti vápenatých iontů jednak na lipoproteiny a lipidické látky s afinitou k HB_sAg, jednak na kritické vysokomolekulární bílkoviny, migrující v oblasti startu v imuno elektroforéze v rozmezí alfa-2 až betaglobulinové frakce lidského séra, které jsou silně imunogenní pro pokusná zvířata. Podstatou vynálezu je vhodná kombinace zmíněného srážecího postupu s chromatografií na sloupci dextranového nebo agaróзовého gelu, umožňující podstatné zúžení bílkovinného spektra se současným odstraněním volného i na bílkoviny vázaného tetracyklinu. Filtrát, obsahující IgG, IgA, IgM a některé další bílkoviny se zahustí a injikuje se produkčním zvířatům ve třech postupných dávkách. Ze získaných hyperimunních sér se odstraní nespecifické protilátky bílkovinami, vyvločkovány účinkem subgelifikačního přídavku glutaraldehydu a následujícím přídavkem siranu hlinitodraselného k lidské HB_sAg negativní plasmě. Sorbent se přidává k hyperimunnímu séru ve formě promytých vloček. Po 24 hodinách stání při +4 °C se vločky sorbentu s navázanými nespecifickými protilátkami odstraní pouhým prolitím suspenze sílonovým sítem. V případě, že konečný výrobek, t.j. diagnostické sérum má být využíváno výhradně jen k průkazu HB_sAg a nikoli k výrobě čistého imunoglobulinu, odstraňují se nespecifické protilátky z diagnostika pouhým přídavkem tekuté lidské HB_sAg negativní plasmy a následujícím odstředěním vzniklého imunoprecipitátu po 24 hodinách stání směsi při +4 °C.

Vynález dosahuje nového a vyššího účinku v tom, že odstraňuje nutnost ultracentrifugace HB_sAg séra v hustotním gradientu po dobu 24 hodin, přičemž purifikační úkony, zajišťující plnou reprodukovatelnost výrobního postupu a přesnou specifitu výrobku jsou redukovány na rychle a snadno proveditelné operace. Výroba diagnostika podle vynálezu záměrně ponechává některé sérové bílkoviny v imunizačních dávkách, avšak jen takové, vůči nimž vzniklé zvířecí protilátky jsou snadno odstranitelné z diagnostika přídavkem lidské plasmy. Lipoproteiny a kritické silně imunogenní sérové proteiny jsou chlortetracyklinem

a chromatografií odstraněny, přičemž imunochemické vlastnosti HB_sAg jsou plně zachovány. Protože imunogen je oproštěn od většiny sérových bílkovin, lze jej aplikovat v zahuštěné koncentrované formě a dosáhnout tak příznivou protilátkovou odpověď imunizovaných zvířat na HB_sAg. K adsorbci nespecifických protilátek se používá t.zv. sběrová plasma, což je v podstatě odpadový materiál, vzniklý slitím velkého počtu individuálních lidských plasem, zbývajících po různých vyšetřeních. Sběr této odpadní plasmy je organizován v rámci výroby gamaglobulinu, takže tento materiál je dosažitelný levně v objemech, plně pokrývajících potřebu. Protože plasma se k diagnostiku přidává v téměř nerozpustném stavu, je stupeň kontaminace diagnostika lidskými bílkovinami zanedbatelný. Je-li však konečný výrobek t.j. diagnostické sérum určeno výhradně jen k průkazu HB_sAg a nikoli k výrobě čistého imunoglobulinu, je velmi výhodné přidat lidskou plasmu v tekutém stavu a vzniklý imuno-precipitát odcentrifugovat. Kontaminace diagnostika je v tomto případě velmi značná, avšak k uvedenému účelu není na závalu a výrobní postup se ještě více zjednoduší. Diagnostikum, vyrobené podle vynálezu je plně vyhovující k průkazu HB_sAg dvojitou imunodifuzí a protisměrnou elektroforézou. Podle výsledků kontrol diagnostika, vyrobeného podle vynálezu, provedených specializovaným pracovištěm, dosahuje identity linií v imunodifuzních testech se všemi testovanými šestnácti diagnostiky domácího i zahraničního původu/Behring, Hyland, Imuno-Wien atd./ a dává naprosto správné výsledky s panelem známých, standartních HB_sAg negativních a pozitivních sér. Souhrnně lze říci, že vynález slučuje všechny výhody dosavadních výrobních postupů/ t.j. jednoduché a snadné provedení, ekonomicky výhodné, velká, prakticky neomezená výrobní kapacita, nezávadnost imunogenu po stránce antigenního stimulu, uspokojivé parametry výrobku. Velkou výhodou je možnost krytí potřeb zdravotnického terénu, vynález umožňuje depistáž HB_sAg v masovém měřítku, což by při složitější technologii bylo stěží možné. Vynález je perspektivní, neboť z výsledného diagnostického séra lze snadno izolovat imunochemicky čistý IgG, konjugovatelný s fluoresceinisocyanátem, enzymem apod. a vyzkoušet jej v progresivnějších metodách průkazu HB_sAg, než jsou metody imunoprecipitační.

Konkretní příklad výrobního postupu

100 ml lidského HB_sAg pozitivního séra/směs nejméně 60 různých malých zbytků sér z různých vyšetření/ se smísí se 40ml 1% vodného roztoku chlortetracyklinu při 20 °C, a po kapkách za stálého míchání se přidá 1 ml 1M chloridu vápenatého, přičemž vznikne sraženina. Směs se poté nechá stát při 20 °C 30 minut a po této době se odstředí nebo sfiltruje. Čirý, žlutě zbarvený filtrát se pak filtruje v trubici 60x 3 cm silnou vrstvou dextranového nebo agaróзовého gelu, suspendovaného v 0,15 M chloridu sodném, upraveným fosfátovým tlumivým roztokem na pH 6,8. Tekutina, profiltrovaná vrstvou gelu, se jímá v podílech 5 ml až do té doby, kdy z trubice počně vytékat intenzivně žlutá kapalina, obsahující tetracyklin, vázaný na sérové bílkoviny. Získané podíly filtrátu se analyzují protisměrnou elektroforézou na přítomnost HB_sAg a podle výsledků analýzy se sloučí pouze ty frakce, které obsahují HB_sAg. Získaná směs se zahustí na objem 10 ml tak, že se vloží do kolodiových sáčků/membránových filtrů/ a sáčky se zasunou do suspenze sodné soli karboxymethylcelulózy medové konzistence a ponechají stát při +4 °C v lednici

nejméně 24 hodin, resp. tak dlouho, aby celkový objem kapaliny v sáčcích byl menší než 10 ml. Množství suspenze karboxymethylcelulózy je v širokých mezích libovolné, podmínkou však je, aby každý kolodiový sáček byl obklopen nejméně 2 cm silnou vrstvou suspenze. Hustota suspenze má být co největší, avšak nesmí bránit nenásilnému zasunutí kolodiového sáčku do prostředí. Výslednou zahuštěnou kapalinu pak upravíme na objem 10 ml a injikujeme ji produkčním zvířetům/vepřům/ intramuskulárně. Imunizujeme současně 10 vepřů, každému zvířeti 1 ml po malých dávkách do několika míst těla. Objem injikované frakce s výhodou zvětšujeme přidávkou vhodného adjuvans, například adjuvans s hydroxydem hlinitým. Za tři týdny injekci stejným způsobem opakuje s nově připraveným imunogenem a za další tři týdny podáme ještě třetí imunizační dávku. Za 7 až 10 dnů zvířata vykrváčíme, odebraná krev se ponechá ustát 24 hodin při $+4^{\circ}\text{C}$ a vyloučené sérum od krvinek oddělíme odstředěním. Sérum jednotlivých imunizovaných zvířat se sloučí dohromady a změní se celkový objem. Nespecifické protilátky z diagnostika se odstraní tímto způsobem: K souhlasnému objemu lidské plasmy se za stálého míchání přidá 0,012 objemu vodného 25%ního roztoku glutaraldehydu při 20°C a ke zhoustlé směsi po 30 minutách stání se za stálého míchání přilije 0,24 objemu 10% roztoku síranu hlinitodraselného, přičemž směs vločkuje v kyprých vločkách. Vzápětí, jak směs vyvločkuje, přilije se za stálého míchání pětinasobek objemu dest. vody a vločky se zachytí přelitím směsi sítím s otvory 0,3 až 0,5 mm. Vločky, zachycené sítím se pak promyje pětinasobkem objemu 0,15 M chloridu sodného, zachytí se sítím a promytí se ještě jednou opakuje, tentokrát při $+4^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 hodin. Vločky se pak zachytí sítím a přidají se k diagnostiku. Vysycování diagnostika probíhá 24 hodin při $+4^{\circ}\text{C}$. Po této době se vločky z diagnostika opět oddělí, produkt se filtruje bakteriologickým filtrem, konzervuje se přidávkou azidu sodného v koncentraci 0,01%, rozplní se do ampulek/na př. v objemu po 1 ml/ a usuší se mrazovou sublimací. Výsledný produkt je vyhovující, je-li kontrola imuno elektroforézou s použitím panelu známých, standartních HB_gAg negativních a pozitivních sér ve shodě s očekávanými výsledky, tj. diagnostikum musí s HB_gAg pozitivními séry v imuno elektroforetické analýze reagovat za vzniku precipitační linky, zatímco žádná HB_gAg séra negativní nesmí v imuno elektroforéze pozitivně reagovat. Počet kontrol, uznávaný jako minimum, je 15 sér od obou skupin, doporučuje se však větší počet, nejlépe, provádí-li kontrolu specializované pracoviště na klinickém a dárcovském materiálu. V případě, že diagnostické sérum je určeno výhradně jen k průkazu HB_gAg a není určeno k výrobě čistého IgG /protilátky/, zjednodušuje se výrobní postup ve fázi odstranění nespecifických protilátek: namísto vloček bílkovin, imobilizovaných srážecím postupem se k diagnostiku přidá tentýž objem lidské plasmy tekuté, směs se ponechá 24 hodin stát při $+4^{\circ}\text{C}$ a vzniklý imunoprecipitát se odcentrifuguje. Ostatní fáze výroby jsou shodné, včetně závěrečné kontroly.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby diagnostického séra k průkazu HB_sAg/hepatitis B povrchového antigenu/ a k produkci HB_sAb/protilátky/, vyznačený tím, že se na lidské HB_sAg pozitivní sérum, získané nejméně od 60 pozitivních jedinců působí roztokem chlortetracyklinu v přítomnosti vápenatých iontů, vzniklá sraženina se odfiltruje a filtrát se profiltruje vrstvou dextranového nebo agarózového gelu, podíly filtrátu, obsahující HB_sAg se zahustí a injikují produkčním zvířatům například vepřům, koním, králíkům, morčatům, ovčím a sérum imunizovaných zvířat se upraví přidavkem lidského HB_sAg negativního séra nebo plasmy v tekutém nebo vločkováném stavu, přičemž vločkování se dosáhne postupným působením glutaraldehydu a síranu hlinitodraselného na snížení HB_sAg negativní sérum nebo plasmu.
2. Způsob výroby diagnostického séra podle bodu 1, vyznačený tím, že na 1 objemový díl HB_sAg pozitivního séra se působí přidavkem 0,4 objemu 1%ního vodného roztoku chlortetracyklinu při 20 °C po dobu 3 až 5 minut, po kapkách se přidá 0,01 objemu roztoku 1M chloridu vápenatého, směs se ponechá 30 minut stát v klidu při 20 °C, načež se sraženina bílkovin odfiltruje a čirý filtrát se dále zpracuje.
3. Způsob výroby diagnostického séra podle bodu 2, vyznačený tím, že filtrát ekvivalentní 0,1 litru výchozího HB_sAg pozitivního séra se profiltruje vrstvou 60x3 cm suspenze dextranového nebo agarózového gelu, přičemž se jímají podíly po 5 ml do té doby, než z vrstvy počne vytékat intenzivně žlutá kapalina, obsahující chlortetracyklin, vázaný na sérové bílkoviny.
4. Způsob výroby diagnostického séra podle bodu 3, vyznačený tím, že jednotlivé podíly filtrátu se analyzují na obsah HB_sAg, pozitivní podíly se sloučí, zahustí se na objem 10 ml a injikují se produkčním zvířatům, například vepřům.
5. Způsob výroby diagnostického séra podle bodu 4, vyznačený tím, že 1 ml zahuštěného HB_sAg se injikuje vepři intramuskulárně do různých míst těla, injekce se ještě dvakrát opakuje v intervalu tří týdnů, přičemž se současně imunizuje skupina nejméně deseti zvířat.
6. Způsob výroby diagnostického séra podle bodu 5, vyznačený tím, že za týden až 10 dnů po poslední injekci HB_sAg se zvířata vykrvácejí, krev se ponechá ustát několik hodin, až se vyloučí sérum, sérum se od krvínek oddělí odstředěním, séra všech zvířat se slíjí dohromady a změní se výsledný objem.
7. Způsob výroby diagnostického séra podle bodu 6, vyznačený tím, že diagnostické sérum se ze zvířecího séra získá přidavkem souhlasného objemu lidské HB_sAg negativní plasmy nebo séra, vyvločkováných glutaraldehydem a síranem hlinitodraselným.
8. Způsob výroby diagnostického séra podle bodu 7, vyznačený tím, že vyvločkování lidské HB_sAg negativní plasmy nebo séra se dosahuje přidavkem 0,012 objemového dílu 25%ního roztoku glutaraldehydu při 20 °C s následujícím přidavkem 0,24 objemového dílu 10%ního roztoku síranu hlinitodraselného, vzniklé vločky se promyjí nadbytkem destilované vody a 0,15 M chloridem sodným po dobu 24 až 48 hodin při +4 °C, oddělí

198 802

se sítem od promývací kapaliny a přenesou se do zvířecího séra.

9. Způsob výroby diagnostického séra podle bodu 8, vyznačený tím, že v případě výhradního využití diagnostického séra k průkazu HB_sAg a nikoli k produkci HB_sAb/protilátky/, získá se diagnostické sérum ze zvířecího séra přidavkem souhlasného objemu lidského HB_sAg negativního séra nebo plasmy, směs se ponechá 24 hodin až týden při +4 °C ustát a vzniklý imunoprecipitát se odstraní filtrací nebo odstředěním.