ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA
(19)

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

224 345

(11) (B1)

(61)
(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 09 04 82
(21) PV 2567-82

(51) Int. Cl.³ A 61 K 39/395
C 25 B 7/00

(40) Zveřejněno 29 04 83
(45) Vydáno 01 07 84

(75)
Autor vynálezu PRUSÍK ZDENĚK RNDr. CSc., PRAHA
KAŠIČKA VÁCLAV RNDr., PRAHA
FRANĚK FRANTIŠEK RNDr. DrSc. člen korespondent ČSAV, PRAHA
KUBÁNEK VLADIMÍR doc. ing. CSc., KRALUPY NAD VLATVAOU
VIKLICKÝ VLADIMÍR MUDr. CSc., PRAHA

(54) Způsob isolace monoklonálních protilátek elektrodesorpcí ve stejnosměrném elektrickém poli

224 345

Vynález se týká způsobu isolace monoklonálních protilátek elektrodesorpcí z imobilizovaného antigenu ve stejnosměrném elektrickém poli.

Protilátky sloužící diagnostickým účelům se v některých případech mohou používat bez čištění, tj. jako séra případně jako ascitické tekutiny produkčních zvířat. Pro přesné imunochemické mikroanalysy, pro léčebné účely nebo pro účely isolace antigenních substancí pomocí imobilizovaných protilátek je třeba vyrobit preparáty protilátek, v nichž je obsah balastních bílkovin potlačen na minimum. Potlačení obsahu balastních bílkovin v preparátech protilátek se dosud dosahuje několika způsoby. Nespecifickými metodami, jako je vysolování nebo chromatografie na DEAE-celulose, se získává méně čistý imunoglobulin, v němž vedle žádané protilátky převažují imunoglobuliny jiné povahy. V takto získaných preparátech mohou být ve stopových množstvích přítomny proteolytické enzymy pocházející z výchozí tělní tekutiny; těmito enzymy jsou protilátky během skladování postupně degradovány.

Dále jsou používány způsoby založené na principu afinitní chromatografie. Imobilizovanou složkou může být např. stafylokokový protein A, na nějž se váží téměř všechny imunoglobuliny. Z afinitního sorbentu vytěsněný preparát je poměrně čistý imunoglobulin. Tento postup však nerozlišuje mezi aktivní protilátkou a nespecifickým imunoglobulinem.

Aktivní protilátka se účinně isoluje pomocí k ní příslušného komplementárního antigenu v imobilizované formě. Způsoby využívající imobilizovaných antigenů poskytují preparáty zbavené všech příměsí a jsou vhodné jak pro náročné analytické účely,

tak pro účely preparativní, kde jinak příměsi citelně snižují kapacitu sorbentu s imobilizovanou protilátkou, a tím nepříznivě ovlivňují ekonomiku preparačního postupu. Adsorbovanou protilátku je třeba z imobilizovaného antigenu uvolnit. Nejšetrnější způsob je vytěsnění protilátky nízkomolekulárním haptenem. Tento způsob se dá však použít pouze u protilátek proti syntetickým strukturám, kde lze hapten syntetizovat a nemá význam u protilátek nejčastěji připravovaných a v průmyslu používaných, tj. u protilátek proti přírodním antigenům. Kromě toho představuje odstranění haptenu z vazebných míst protilátky další nezbytnou operaci.

Obecně použitelné způsoby vytěsnění jsou: změna pH elučního pufru, změna iontové síly elučního pufru, změna teploty elučního pufru, přídavek chaotropních činidel nebo detergentů do elučního pufru, případně kombinace uvedených metod. Společnou nevýhodou užívaných způsobů uvolňování protilátek je, že po odstranění disociačního agens nebo po neutralizaci ztratí část protilátky rozpustnost, čímž dochází k citelným ztrátám, které mohou činit až 50 %.

Je znám též způsob elektrodesorpce protilátek z imobilizovaného antigenu stejnosměrným elektrickým polem v homogenním elektrolytu. Elektrodesorpce nevyžaduje přídavku žádného disociačního agens a zpravidla se dá provést v nedenaturujících podmínkách. Nevýhodou tohoto postupu je pomalé uvolňování protilátek ve velmi zředěném stavu.

Uvedené nevýhody dosud používaných způsobů odstraňuje způsob isolace monoklonálních protilátek podle tohoto vynálezu. Jeho podstata spočívá v tom, že adsorbované protilátky na imobilizovaném antigenu se desorbují v izotachoforetickém systému elektrolytů. Izotachoforetický systém elektrolytů se skládá z vedoucího elektrolytu, jenž obsahuje vedoucí ion s efektivní pohyblivostí vyšší, než je efektivní pohyblivost protilátky, a protiion s ionogenní skupinou, jejíž pK_a je v rozsahu 4,5 až 9,5 a z koncového elektrolytu, který obsahuje koncový ion s efektivní pohyblivostí nižší než je efektivní pohyblivost desorbované proti-

látky a libovolný protiion. Koncentrace vedoucího iontu je v rozmezí 0,001 až 0,05 mol/l a koncentrace koncového iontu 0,001 až 0,1 mol/l. Adsorbované protilátky se z imobilizovaného antigenu uvolňují do roztoku působením stejnosměrného elektrického pole intensity 5 až 300 V/cm v izotachoforetickém systému elektrolytů.

Výhodou způsobu podle vynálezu je rychlé uvolňování protilátek z imobilizovaného antigenu v nedestruktivních a nedenaturujících podmínkách a možnost získání roztoků čistých protilátek v koncentracích až několika hmotnostních %, kde koncentraci desorbované protilátky lze řídit koncentrací vedoucího iontu ve vedoucím elektrolytu.

Vynález a jeho výhody jsou blíže vysvětleny pomocí dále uvedených příkladů jeho provedení.

Příklad 1

Imunoglobulin získaný z myší ascitické tekutiny, obsahující monoklonální protilátku podtřídy IgG1 proti prasečímu transferinu preparativní zonovou elektroforesou ve škrobovém bloku při pH 8,6 v 50 mmol/l diethylbarbituratovém pufru /diethylbarbiturát sodný - kyselina diethylbarbiturová/, byl rozpuštěn v 0,15 mol/l chloridu sodném na koncentraci 0,28 hmotnostních %. Odděleně byl připraven vedoucí elektrolyt o pH 5,9 sestávající z 0,01 mol/l hydroxidu sodného a 0,03 mol/l kyseliny 2-/N-morfolino/ethansulfonové a koncový elektrolyt sestávající z 0,01 mol/l kyseliny 6-aminokapronové adjustované kyselinou chlorovodíkovou na pH 5,2.0,5 ml roztoku imunoglobulinu bylo smíseno s 5 ml vedoucího elektrolytu a k výslednému roztoku bylo přidáno 100 mg afinitního sorbentu připraveného z 15 mg prasečího transferinu a 85 mg jemně granulovaného polyethylenglykoltereftalátu polymerací pomocí glutaraldehydu. Po 20 min. průběhu adsorpce protilátek za míchání byla tekutina odstraněna a afinitní sorbent s adsorbovanou protilátkou byl promyt 20 ml vedoucího elektrolytu. Promytý afinitní sorbent s adsorbovanou protilátkou byl umístěn na rozhraní mezi vedoucí elektrolyt a koncový elektrolyt. Na tento systém bylo zavedeno stejnosměrné elektrické pole, anoda do koncového elektrolytu, katoda do vedoucího elektrolytu. De-

sorpce probíhala při intensitě pole od 8 do 80 V/cm 60 min. při teplotě vrstvy sorbentu 20 až 25°C. Z prostoru mezi vrstvou sorbentu a katodou bylo získáno 25 µl 1% roztoku protilátky o pH 5,3. Po zředění na 0,5 ml a úpravě pH na 7,0 zůstal roztok protilátky zcela čirý. Vazebná aktivita protilátky zůstala zachována, jak bylo ověřeno imunoprecipitačním testem.

Příklad 2

Imunoblobulin získaný z myší ascitické tekutiny, obsahující protilátku podtřídy IgG1 proti prasečímu transferinu, byl rozpuštěn v 0,15 mol/l chloridu sodném na koncentraci 0,28 hmotnostních %. Odděleně byl připraven vedoucí elektrolyt sestávající z 0,02 mol/l hydroxidu sodného a 0,06 mol/l kyseliny 2-/N-morfolino/ ethansulfonové a koncový elektrolyt sestávající z 0,02 mol/l kyseliny 6-aminokapronové adjustované kyselinou chlorovodíkovou na pH 5,2. 0,5 ml roztoku imunoglobulinu bylo smíseno s 5 ml vedoucího elektrolytu a k výslednému roztoku bylo přidáno 100 mg afinitního sorbentu připraveného z 15 mg prasečího transferinu a 85 mg jemně granulovaného polyethylenglykoltereftalátu polymerací pomocí glutaraldehydu. Po 20 minutách průběhu adsorpce protilátek za míchání byla tekutina odstraněna a afinitní sorbent s adsorbovanou protilátkou byl promyt 20 ml vedoucího elektrolytu. Promytý afinitní sorbent s adsorbovanou protilátkou byl umístěn na rozhraní mezi vedoucí elektrolyt a koncový elektrolyt. Na tento systém bylo zavedeno stejnosměrné elektrické pole, anoda do koncového elektrolytu, katoda do vedoucího elektrolytu. Desorpce probíhala při intenzitě pole 8 až 80 V/cm 60 minut při teplotě vrstvy sorbentu 20 až 25°C. Z prostoru mezi vrstvou sorbentu a katodou bylo získáno 25 µl 2% roztoku protilátky o pH 5,0. Po zředění na 0,5 ml a úpravě pH na 7,0 zůstal roztok protilátky čirý. Vazebná aktivita protilátky zůstala zachována, jak bylo ověřeno imunoprecipitačním testem.

Příklad 3

Imunoglobulin získaný z myší ascitické tekutiny, obsahující monoklonální protilátku podtřídy IgG1 proti lidskému transferinu, byl rozpuštěn v 0,12 mol/l chloridu sodném na koncentraci 1,0 hmotnostní %. Odděleně byl připraven vedoucí elektrolyt

o pH 5,2 sestávající z 0,01 mol/l hydroxidu draselného adjustovaného kyselinou octovou na žádané pH a koncový elektrolyt sestávající z 0,01 mol/l β-alaninu adjustovaného kyselinou octovou na pH 5,1. 100 µl roztoku imunoglobulinu bylo smíseno s 5 ml vedoucího elektrolytu a k výslednému roztoku bylo přidáno 100 mg afinitního sorbentu připraveného z 15 mg lidského transferinu a 85 mg jemně granulovaného polyethylenglykoltereftalátu polymerací pomocí glutaraldehydu. Po 15 min. průběhu adsorpce protilátek za míchání byla tekutina odstraněna a afinitní sorbent s adsorbovanou protilátkou byl promyt 15 ml vedoucího elektrolytu. Promytý afinitní sorbent s adsorbovanou protilátkou byl umístěn na rozhraní mezi vedoucí elektrolyt a koncový elektrolyt. Na tento systém bylo zavedeno stejnosměrné elektrické pole, anoda do koncového elektrolytu, katoda do vedoucího elektrolytu. Desorpce probíhala po dobu 40 minut při intensitě pole od 5 do 50 V/cm při teplotě vrstvy sorbentu 18-20°C. Z prostoru mezi vrstvou sorbentu a katodou bylo získáno 25 µl 1,2% roztoku protilátky o pH 5,0. Po zředění na 0,5 ml a úpravě pH na 7,0 zůstal roztok protilátky zcela čirý. Vazebná aktivita protilátky zůstala zachována, jak bylo ověřeno imunoprecipitačním testem.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

224 345

1. Způsob isolace monoklonálních protilátek elektrodesorpcí v stejnosměrném elektrickém poli, vyznačující se tím, že protilátky adsorbované na imobilizovaném antigenu se desorbují v isotachoforetickém systému elektrolytů skládajícím se z vedoucího elektrolytu, jenž obsahuje vedoucí ion v množství 0,001 až 0,05 mol/l s efektivní pohyblivostí vyšší, než je efektivní pohyblivost protilátky, a protiion s ionogenní skupinou, jejíž pK_a je v rozsahu 4,5 až 9,5, a z koncového elektrolytu, který obsahuje koncový ion v množství 0,001 až 0,1 mol/l, jehož efektivní pohyblivost je nižší než efektivní pohyblivost desorbované protilátky, a libovolný protiion.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že adsorbované protilátky se desorbují z antigenu imobilisovaného na rigidních částicích nosiče neprostupných pro elektrolyt, s výhodou na částicích z polymerů na bázi diolů a dikarboxylových kyselin, například polyetylenglykoltereftalátu.