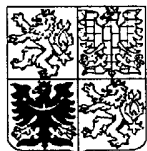


PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

287 488

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1998 - 2288

(22) Přihlášeno: 02.02.1996

(30) Právo přednosti:
02.02.1996 WO 1996/IE960000
3

(40) Zveřejněno: 17.03.1999
(Věstník č. 3/1999)

(47) Uděleno: 09.10.2000

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 13.12.2000
(Věstník č. 12/2000)

(86) PCT číslo: PCT/IE96/00003

(87) PCT číslo zveřejnění: WO 97/28449

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl. ⁷:
G 01 N 33/573

(73) Majitel patentu:

BIOTRIN INTELLECTUAL PROPERTIES
LIMITED, Mount Merrion, IE;

(72) Původce vynálezu:

Doyle John Martin, Deansgrange, IE;
Kilty Cormac Gerard, Sandycove, IE;
Manning Fiona Mary, Lusk, IE;

(74) Zástupce:

Reichel Pavel, P.O.Box 52, Praha 1, 11121;

(54) Název vynálezu:

**Způsob určení stavu jaterních funkcí jedince,
včetně příjemce jaterního štěpu**

(57) Anotace:

Způsob určení stavu jaterních funkcí spočívá v tom, že se měří hladiny izoformy pí glutathion S-transferázy (π GST) ve vzorku biologické tekutiny tohoto jedince pomocí imunoeseje, specifické pro izoformu π GST, naměřené hladiny π GST se porovnávají s normálním rozmezím pro π GST v dané biologické tekutině s tím, že se na základě hladin π GST v dané biologické tekutině vyhodnotí stav jaterních funkcí jedince, pokud jsou zjištěny zvýšené hodnoty π GST ve srovnání s normálním rozmezím. Způsob je možno uplatnit zvláště při transplantacích jater.

CZ 287488 B6



CZ 287488B6
Batch : DEC2000

Způsob určení stavu jaterních funkcí jedince, včetně příjemce jaterního štěpu

Oblast techniky

5

Vynález se týká způsobu určení stavu jaterních funkcí jedince, včetně příjemce jaterního štěpu, a v návaznosti na zjištěný stav se týká rozhodování o nápravném opatření, pokud je ho zapotřebí.

10

Dosavadní stav techniky

Schopnost rozlišit různé typy poškození jater má velký význam pro léčbu jak pacientů po transplantaci, tak i jedinců, kteří trpí různými chorobami jater, jež mohou ovlivňovat systém žlučových cest.

15

Glutathion S-transferázy (GST) zahrnují multigenovou rodinu proteinů, kterou tvoří hlavně izoformy alfa (α GST), mí (μ GST), pí (π GST) a theta (θ GST), definované izoelektrickým bodem, jež se podílejí na detoxifikaci řady xenobiotik, hlavně prostřednictvím vazby na glutathion (Beckett. G.J., Hayes. J.D., *Advances in Clinical Chemistry*, 1993, Vol. 30, p. 281-380). Obecně se jedná o dimerické proteiny, sestávající ze dvou podjednotek o velikosti 25 až 27 kDa, které mohou existovat v homodimerické nebo heterodimerické formě. Pí glutathion S-transferáza (π GST) je homodimer a vyskytuje se v cytoplazmě epitelových buněk žlučového v játrech (Beckett. G.J., Hayes. J.D., 1993, *supra*). O α GST je známo, že je přítomna v hepatocytech uvnitř jater a existuje v homodimerickém i heterodimerickém stavu (Campbell, J.A.H., et al., *Cancer. Philadelphia*, 1991, Vol. 67, p. 1608-1613; Howie. A.F., et al., *Clin. Chem. Acta*, 1988, Vol. 177, p. 65-76). Tato heterogenní distribuce izoform α GST a π GST naznačuje, že různé izoenzymy plní in vivo jedinečné funkce v různých oblastech jater (Campbell, J.A.H., et al., 1991, *supra*).

20

25

30

EP A 0 640 145 popisuje způsob časného stanovení diagnózy rejekce u příjemce jaterního štěpu, který je založen na měření zvýšení α GST v plazmě nebo v séru příjemce při nepřítomnosti změn (nebo před změnami) plazmatických nebo sérových hladin transamináz. Bylo jednoznačně prokázáno, že měření plazmatických hladin α GST usnadňuje monitorování stavu jater po transplantaci a že jde o nesmírně citlivý, i když ne úplně specifický, marker rejekce štěpu.

35

Je pozoruhodné, že π GST, jakožto potenciálnímu markeru rejekce štěpu, nebyla věnována žádná pozornost, zřejmě vzhledem k nízkým hladinám tohoto enzymu, přítomného v biliárních epitelových buňkách jater. Jsou však k dispozici jisté průkazy o tom, že α a π GST jsou přítomny ve žluči jak zdravých jedinců, tak i jedinců, trpících specifickými formami rakoviny (např. cholangiocarcinomem), což lze zjistit pomocí radioimunoeseje (Howie, A.F., et al., *Clin. Chem. Acta*, 1989, Vol. 184, p. 269-278). Kromě toho se někteří autoři zmínili o tom, že měření sérových a plazmatických hladin π GST může usnadnit stanovení diagnózy maligních nádorů, protože se zdá, že v maligních tkáních dochází ke specifické expresi π GST (Niitsu. Y., et al., *Cancer*, 1989, Vol. 63, p. 317-323; Howie, A.F., et al., *Clin. Chem.*, 1990, Vol. 36 (3), p. 453-456). Žádný z výše uvedených autorů neupozornil na skutečnost, že by se π GST mohla uplatnit v predikci rejekce jaterního štěpu nebo jiných poruch funkce jater či žlučníku.

45

Jak známo, k primární rejekci štěpu obvykle dochází v biliárním stromu uvnitř jater (Ascher. N., In: *Immunology of liver transplantation*. Ed. Neuberger. J., Adams. D., 1993), zdá se tedy, že by specifické měření hladin π GST ve žluči nebo v plazmě mohlo pomoci ke stanovení diagnózy časné rejekce, nebo usnadnit rozlišení mezi postransplantačním hepatocelárním poškozením a poškozením biliárním. Význam odlišení nespecifického poškození jater od rejekce štěpu nelze vůbec docenit, protože léčba obou stavů se naprosto liší. Kromě toho by zahájení nesprávné

50

lěčby mohlo mít nesmírně negativní důsledky na zdraví již těžce nemocného jedince. Pokud například dojde k poškození štěpu virovou infekcí (např. reinfekce hepatitidou typu C nebo infekce cytomegalovirem [CMV]), je třeba pečlivě monitorovat úroveň anti-rejekční imunosupresivní léčby, protože nadměrná aplikace imunosupresiv (např. cyklosporinu A nebo FK506) by mohla podstatně zhoršit schopnost obrany proti virové infekci. Nerozlišení skutečné rejekce od nespecifického poškození štěpu by také obráceně mohlo vést k oddálení intenzifikace imunosupresivní terapie, a v konečných důsledcích ke ztrátě štěpu.

Je tedy silně pocíťována potřeba metody, vhodné k určování stavu jaterních funkcí u jedinců s různými chorobami nebo s patologickým stavem jater.

Podstata vynálezu

Vynález poskytuje způsob určení stavu jaterních funkcí jedince, který spočívá v tom, že se měří hladiny izoformy pí glutathion S-transferázy (π GST) ve vzorku biologické tekutiny tohoto jedince pomocí imunoeseje, specifické pro izoformu π GST, naměřené hladiny π GST se porovnávají s normálním rozmezím pro π GST v dané biologické tekutině, s tím, že se na základě hladin π GST v dané biologické tekutině vyhodnotí stav jaterních funkcí jedince, pokud jsou zjištěny zvýšené hodnoty π GST ve srovnání s normálním rozmezím.

Tento další způsob určení stavu jaterních funkcí s použitím markeru, specifického pro konkrétní oblast jater, významně usnadňuje léčbu pacientů s různými chorobnými stavy a dalšími patologickými stavy jater, jak je podrobněji popsáno dále.

Vhodným subjektem je příjemce jaterního štěpu a stav jaterních funkcí se určuje po transplantaci.

Vynález je použitelný zvláště v případě transplantace jater; umožňuje totiž ve velmi časném stádiu po transplantaci určit pravděpodobnost rejekce, protože k primární rejekci štěpu obvykle dochází v biliárním stromu uvnitř jater, jak bylo konstatováno výše. Způsob podle vynálezu umožňuje dokonce ještě časnější detekci rejekce jaterního štěpu, než metoda, popsaná a nárokovávaná v EP A 0 640 145.

Ve výhodném provedení je příjemcem štěpu člověk.

Výhodnou imunoesejí je enzymoimunoesej, konkrétněji sendvičová enzymoimunoesej.

Způsobu podle vynálezu lze použít k měření hladin π GST v řadě médií, zvláště však ve žluči, plazmě a v séru.

Biologickou tekutinou jsou zde myšleny např. tělesné tekutiny, jako je žluč, plazma, sérum a moč, jakož i podpůrná tkáňová média a perfuzáty. Biologické tekutiny jsou obecně označovány jako matrix.

Způsob podle vynálezu je první, který usnadňuje detekci hladin izoenzymu π GST ve žluči.

Pokud je biologickou tekutinou žluč, dosahují normální hladiny π GST hodnoty nižší než 15 μ g/l.

Pokud je biologickou tekutinou plazma, dosahují normální hladiny π GST hodnoty nižší než 100 μ g/l.

Jak bude uvedeno dále, v případě, že biologickou tekutinou při použití způsobu podle vynálezu je plazma, je nutno dbát, aby byla odebrána a skladována v přítomnosti nějakého antikoagulačního přípravku za podmínek, které zabrání, aby během skladování došlo k hemolýze.

5 Zjistili jsme, že použití fluoroxylátových zkumavek vede k větší intenzitě hemolýzy, přičemž dochází k uvolňování π GST z erytrocytů, což má za následek falešně zvýšené hladiny π GST. Jiné izoenzymy GST buď nejsou v krvi vůbec zjištěny, nebo jsou přítomny v extrémně nízkých hodnotách. Například μ GST je přítomna v leukocytech. Z literatury však není jasné zda se
10 nachází i v erytrocytech. V každém případě je μ GST přítomna pouze u 50 % populace. θ GST vykazuje podobnou interindividuální variabilitu jako μ GST, a pokud je v krvi přítomna, jsou její hladiny extrémně nízké, α GST není v krvi ve větším měřítku přítomna.

Ve výhodném provedení se vzorek zředí pomocí ředidla, obsahujícího účinné množství proteinu, který optimalizuje reakce protilátka-antigen.

15 Zjistili jsme, že pokud ředidlo obsahuje Tween 20, látku, běžně používanou jako standardní reagensium v imunometrických metodách, jsou zjišťovány nesprávné koncentrace π GST. Zjistili jsme, že pokud se použije účinné množství proteinu, který optimalizuje reakce protilátka-antigen, může být dosaženo lineární titrace, jak je uvedeno v příkladu 6.

20 Výhodným proteinem je sérový albumin, jako je albumin kravského séra nebo lidský sérový albumin.

25 Doba trvání imunoeseje podle vynálezu je asi 2,5 hodiny jak dále uvedeno v příkladech. To je doba značně kratší, než u jiných komerčně dostupných analytických postupů, určených ke kvantifikaci π GST.

30 Vynález tedy poskytuje imunoesej, která trvá méně než 2,5 hodiny a která je založena na postupném přidávání vzorku, konjugátu protilátka-enzym a substrátu do mikrotitračních jamek nebo na jiný povrch, potažený monoklonálním anti- π GST IgG. Výsledná intenzita barvy je úměrná množství π GST, přítomného ve vzorku, a citlivost eseje je v rozmezí 0-100 μ g/l. Rozmezí lze snadno rozšířit vyšším naředěním vzorku.

35 Vynález je dále možno aplikovat na měření hladin izoformy alfa glutathion S-transferázy (α GST) ve vzorku biologické tekutiny daného subjektu za účelem snadného rozlišení mezi rejekcí štěpu a nespecifickým hepatocelulárním poškozením.

40 Přehled obrázků

Obr. 1 je schematické znázornění sendvičové enzymoimunoeseje podle příkladu 1.

45 Na obr. 2 jsou vyneseny hodnoty absorbance při 450/630 nm versus logaritmus koncentrace π GST (μ g/l) podle výsledků enzymoimunoeseje pro lidskou π GST, která je popsána v příkladu 1.

Na obr. 3 je SDS-PAGE analýza lidských μ , α a π GST.

50 Na obr. 4 je analýza typu "imunoblot" lidské π GST.

Na obr. 5 jsou vyneseny hodnoty α GST a π GST (ng/ml) ve žluči versus čas (hodiny) po reperfúzi u řady pacientů.

Na obr. 6 jsou vyneseny koncentrace π GST versus čas (dny) u řady pacientů.

Na obr. 7 jsou vyneseny hodnoty AST/ALT (jedn/l), a α GST a π GST (ng/ml) versus dny po transplantaci u jediného pacienta.

5

Příklady provedení vynálezu

Vynález bude dále vysvětlen v následujících příkladech.

10

Příprava A

Čištění lidské π GST

15

π GST byla získána a vyčištěna z lidské placenty pomocí afinitní chromatografie. Přesné podrobnosti čisticí procedury jsou následující:

20

a. 325 g lidské placenty bylo homogenizováno po dobu 2 minut v homogenizačním pufru v poměru jeden díl placenty na tři díly pufru, s použitím Waringova (Waring je obchodní známka) blenderu. Homogenizační pufr měl toto složení:

25

20 mM tris-HCl
250 mM sukrozy
5 mM EDTA 7,8 pH
2 μ g/ml leupeptinu
2 μ g/ml pepstatinu

30

b. Placentární homogenát byl centrifugován při 10 000 g po dobu 60 minut.

35

c. Supernatant byl poté separován pomocí afinitní kolony glutathion (GSH)-sepharose, předem ekvilibrované v 20 mM Tris-HCl s 200 mM NaCl, 7,8 pH. Ekvilibrační pufr byl znovu aplikován k eluci nenavázaného proteinu. Nakonec bylo 50 mM Tris-HCl o pH 9,5 s obsahem 5 mM GSH použito k eluci navázaného GST z afinitní kolony.

40

d. Eluát byl poté dialyzován proti 0,1 M PBS.

Příprava B

40

Produkce a čištění protilátek

45

Vyčištěná lidská π GST byla injikována subkutánně (s.c.) novozélandským bílým králíkům podle dále uvedeného harmonogramu a v séru byla zjišťována anti- π GST reaktivita. Jakmile bylo dosaženo (stanovením pomocí semikvantitativní "dot blot" analýzy) dostatečného titru IgG [protilátky proti lidské π GST], byli králíci zahubeni vykrvácením a bylo shromážděno jejich sérum. Celkový IgG byl purifikován z králíčího séra technikou protein A afinitní chromatografie a byl použit k navázání na křenovou peroxidázu (horseradish peroxidase, HRP). Monoklonální IgG [protilátka proti lidské π GST] byla získána jako ascites z fakultní nemocnice (University Hospital) v nizozemském Nijmegenu a před dalším použitím již nebyla čištěna.

50

Imunizační harmonogram (obecně)

1. den:

5 Z ucha králíka bylo odebráno 5 ml přesera k vyšetření. 0,5 ml antigenu lidské π GST (100 μ g) bylo smícháno se stejným objemem Freundova úplného adjuvans. Směs antigenu a adjuvans byla homogenizována k zajištění kvalitní emulze. Tato směs byla poté injikována subkutánně do několika míst na předem vyholených zádech králíka.

10 28. den:

15 Z ucha králíka bylo k vyšetření odebráno 5 ml séra. 0,5 ml antigenu lidské π GST (100 μ g) bylo smícháno se stejným objemem Freundova úplného adjuvans. Směs antigenu a adjuvans byla homogenizována k zajištění kvalitní emulze. Tato směs byla poté injikována subkutánně do několika míst na zádech králíka.

42. den:

20 Z ucha králíka bylo odebráno 10 ml krve k vyšetření.

56. den:

Králíkovi byla podána druhá upomínací dávka, stejně jako ve 28. den.

25 70. den:

30 Z ucha králíka bylo odebráno 10 ml krve k vyšetření. Při dosažení dostatečně vysokého titru (IgG [protilátka proti lidské π GST], pozn. překl.) byl králík utracen a bylo shromážděno největší možné množství krve.

Příprava C

Analýza "imunoblot"

35 U všech polyklonálních a monoklonálních IgG, určených k použití v následujících příkladech, byla zkontrolována reaktivita vůči π GST a případná zkřížená reaktivita proti lidské α a μ GST (v tomto pořadí), a při tom byly použity tyto "imunoblot" kombinace:

40 (a) králičí IgG [protilátka proti lidské π GST] byla použita k prošetření nitrocelulózových membrán, obsahujících imobilizovanou lidskou α , π a μ GST.

45 (b) myší IgG [protilátka proti lidské π GST] byla použita k prošetření nitrocelulózových membrán, obsahujících imobilizovanou lidskou α , π a μ GST.

Detekce imunoblotu byla provedena následujícím způsobem:

50 1. Na 15 % SDS-PAGE se včleněnými markery molekulární hmotnosti byla provedena elektroforéza lidské α , π a μ GST (0,5 μ g na proužek).

2. Po skončení elektroforézy byl polyakrylamidový gel odříznut, polovina byla obarvena ke stanovení proteinu, a zbytek byl použit k elektroforetickému přenosu na nitrocelulózu.

3. Po elektroforetickém transferu byly nitrocelulózové membrány blokovány po dobu 1 hodiny pomocí 5 % (w/v) Marvelu (Marvel je ochranná známka) ve fosfátovém pufru s obsahem 0,05 % (w/v) blokovacího pufru TWEEN-20 (PBST).

5 4. Poté byly připraveny následující roztoky:

(i) králičí IgG [protilátka proti lidské π GST]
v 1 % (w/v) Marvelu v PBST,

10 (ii) myší IgG [protilátka proti lidské π GST]
v 1 % (w/v) Marvelu v PBST,

a byly přidány na membrány ihned po odlití blokovacího pufru.

15 Inkubace membrán s roztoky protilátek probíhala po dobu jedné hodiny.

5. Pak byly nitrocelulózové membrány opláchnuty v PBST (2x vždy po dobu 5 minut).

20 6. Poté byl připraven konjugát anti-králičí IgG-HRP (1/1000) v 1 % (w/v) Marvelu v PBST a přidán do roztoku, uvedeného výše pod bodem 4 (i). Rovněž byl připraven konjugát anti-myší IgG-HRP (1/1000) a přidán do roztoku, uvedeného výše pod bodem 4 (ii).

25 7. Po jednododinové inkubaci s konjugáty protilátek uvedených živočišných druhů byla činidla zlikvidována a membrány opláchnuty jako v bodu 5.

8. Pak byl na membrány přidán připravený diaminobenzidinový substrát.

Pozitivní reakce se projevila hnědým precipitátem na nitrocelulózové membráně.

30 Příprava D

Syntéza konjugátu anti π GST IgG-křenová peroxidáza (horseradishperoxidase, HRP)

35 Konjugáty anti- π GST IgG-HRP byly syntetizovány s použitím metodiky konjugace thioetheru (Duncan. R.J.S., et al., Anal. Biochem., 1993, Vol. 132, p. 68-73). Reaktivní maleinimidové skupiny byly do molekul IgG zavedeny pomocí SMCC [sukcinimidyl-4- (N-maleinimidomethyl)-cyklohexan-1-karboxylát] a maskované sulfhydrylové skupiny byly navázány na HRP. Poté, co byly odmaskovány s cílem generovat reaktivní sulfhydrylové skupiny, byly maleinimidem aktivované IgG a HRP-SH smíchány dohromady a nechaly se reagovat po 4,5 hodiny. 40 Výsledný konjugát gG-HRP, vzniklý kovalentní vazbou thioetheru, byl přenesen do 50 % (v/v) glycerolu a skladován při teplotě -20 °C k použití v EIA podle příkladu 1.

45 Příklad 1

Sendvičová enzymoimunoesej

50 Imunoesej pro kvantitativní stanovení lidské π GST je klasickou esejí sendvičového typu, jak schematicky znázorňuje obr. 1, a jejíž popis následuje.

a. Mikrotitrační deska Nunc Maxisorp (Nunc Maxisorp je ochranná známka) byla potažena myší monoklonální IgG [protilátkou proti lidské π GST] (odvozenou z přípravy B), imobilizova-

nou pomocí fragmentů kozí F(ab)₂ [anti-myší IgG]. Potažení protilátek slouží k orientování vazebných míst Mab a také zlepšuje citlivost eseje tím, že denaturalizace druhé protilátky (captured antibody), indukovaná adherencí, je omezena na minimum.

5 b. Jako kalibrátor eseje byla použita lidská π GST, získaná purifikací z placenty, jak popsáno v přípravě A.

10 c. Pro snazší detekci zachycené/imobilizované π GST byly použity konjugáty IgG [protilátky proti lidské π GST] a HRP spolu s tetramethylbenzidinovým substrátem (TMB).

15 d. Enzymová reakce byla ukončena přidáním 1 N H₂SO₄ a absorbance byla změřena při 450 nm, referenční vlnová délka byla 630 nm. Intenzita barev byla úměrná koncentraci π GST. Po vynesení hodnot A_{450/630nm} versus koncentrace (μ g/l) lze tedy určit koncentraci neznámých vzorků (viz obr. 2). Celková doba eseje byla kratší než 2,5 hodiny.

Bylo shledáno, že esej trvala celkem 2 hodiny 15 minut; v průběhu inkubace vzorku a konjugátu (v tomto pořadí) bylo zapotřebí třepat mikrotitrační deskou při stálé teplotě. Inkubace substrátu TMB vyžadovala pouze stálou teplotu.

20

Příklad 2

Sběr plazmy pro analýzu π GST

25 Byl zkoumán účinek řady běžně používaných antikoagulancií (kyseliny ethylendiaminotetraoctové [EDTA], lithiového heparinu, citrátu sodného, fluoroxylátu) a dalších inhibitorů destiček, které se používají ve zkumavkách, určených ke sběru plazmy, na plazmatické hladiny π GST. Vzorky byly odebrány venipunkcí do zkumavek, obsahujících konkrétní antikoagulancium. Plazma byla oddělena centrifugací (6000 g po dobu 10 minut), a reziduální destičky byly
30 odstraněny další centrifugací (10 000 g po dobu 10 minut). Po odstranění supernatantu následovala analýza vzorků podle protokolu, popsaného v příkladu 1.

Plazma několika jedinců byla odebrána do řady zkumavek, určených k odběru plazmy. S každým vzorkem se zacházelo, jak je uvedeno výše, a uvolňování π GST do plazmy bylo monitorováno po dobu 24 hodin. Tabulka 1 ukazuje plazmatické hladiny π GST téhož jedince ve 4 různých zkumavkách, jejichž obsah byl analyzován v čase 0 a 24 (T₀, T₂₄). Z výsledků je zřejmé, že přítomnost kteréhokoli z výše uvedených antikoagulancií nezpůsobila významné rozdíly plazmatických koncentrací π GST. Nezdá se, že by skladování neseparované plazmy po dobu do 24 hodin vedlo k významnému zvyšování koncentrace π GST (v důsledku uvolňování π GST z erytrocytů nebo trombocytů). Výjimkou jsou fluoroxylátové zkumavky, při jejichž použití docházelo ve větší míře k hemolýze a k uvolňování π GST z erytrocytů, takže hladiny proteinu byly falešně zvýšené, jak je uvedeno v tabulce 1.
40

Tabulka 1

Srovnání účinku antikoagulancií ve zkumavkách ke sběru plazmy pro analýzu π GTS v plazmě.
 5 Hodnoty jsou uvedeny v $\mu\text{g/l}$.

Pacient	EDTA		Li/Hep.		citrát sodný		fluoroxylát	
	T0	T24	T0	T24	T0	T24	T0	T24
1	171,9	220,2	199,4	194,7	167,5	220,3	170,0	> 500
2	65,6	70,5	62,8	88,4	53,2	65,4	55,4	> 500
3	59,6	78,6	65,4	88,6	53,7	68,4	59,9	> 500
4	81,7	92,8	90,2	119,5	74,9	122,1	81,2	> 500
5	46,7	67,5	44,6	73,3	28,9	68,6	60,9	> 500

Z tabulky 1 je patrné, že neexistuje významný rozdíl mezi koncentracemi π GST v plazmě, získané v přítomnosti kteréhokoli z výše uvedených antikoagulancií.

Příklad 3

Hodnocení čistoty reagensů pro imunoesej

Obr. 3 ilustruje čistotu lidské π GST, která byla získána přípravou A a poté použita k imunizaci králíků; je potvrzena absence jakýchkoli jiných lidských proteinů, které by mohly přispět ke snížené specifitě eseje.

Na obr. 3:

dráha 1 = μ GST

dráha 2 = α GST

dráha 3 = π GST

dráha 4 = markery molekulární hmotnosti.

"Imunoblot" analýza reaktivity monoklonálních protilátek ukázala, že IgG [protilátka proti lidské π GST] byla vysoce specifická pro lidskou π GST a nevykazovala významnou zkříženou reaktivitu s lidskou α nebo μ GST. Výsledky ukazuje obr. 4:

dráha 1 = π GST

dráha 2 = markery molekulární hmotnosti.

Tento nález je podpořen chybějící reaktivitou α nebo μ GST v enzymoimunoeseji se specificitou na lidskou π GST, jejíž výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2

Hodnocení reaktivity lidské α GST a μ GST v enzymoimunoeseji pro detekci lidské π GST

5

Koncentrace GST	A _{450/630} nm		
	π GST	α GST	μ GST
0,00	0,022	0,022	0,022
3,12	0,087	0,024	0,016
12,5	0,299	0,020	0,022
25,0	0,688	0,036	0,055
50,0	1,204	0,018	0,034
100	1,735	0,040	0,043

Z tabulky 2 je zřejmé, že v této eseji nebyla zjištěna žádná zkřížená reaktivita α GST ani μ GST.

10 Tato skutečnost je velmi významná; znamená to, že enzymoimunoesej pro kvantifikaci lidské π GST je pro detekci lidské π GST specifická. Veškerou přítomnost lidské π GST ve vzorcích lze tedy zjistit specificky, bez křížené kontaminace jinými druhy GST.

Příklad 4

15

Kvantifikace π GST ve žluči

20 Řada vzorků žluči, odebraných od pacientů se specifickým postižením funkce jater/žlučových cest, byla vyšetřena pomocí analýzy na přítomnost lidské π GST. Jak ukazuje tabulka 3, u pacientů s hepatocelulárním karcinomem (hepatocellular carcinoma. HCC) a s primární biliární cirhózou (primary biliary cirrhosis. PBC) byly zjištěny velmi vysoké hladiny π GST. U pacienta s kameny ve žlučovodu (bile duct stones. BDS) byly též zjištěny zvýšené hladiny π GST, ne však natolik, jako u pacientů s HCC a PBC.

25

Tabulka 3

Koncentrace π GST ve žluči-pacientů s hepatocelulárním karcinomem (HCC), primární, biliární cirhózou(PBC) a kamenem ve žlučovodu (BDS)

30

Typ postižení	Hladiny π GST (μ g/l]
HCC	5357
PBC	2432
BDS	506,6

Všechny tyto vzorky vykazují významně zvýšené hladiny π GST.

Příklad 5

Využitelnost kvantifikace π GST v klinické praxi

5

Od pacientů po transplantaci jater byly postupně odebírány vzorky žluči a plazmy a vyšetřovány na π GST (ve žluči) a α GST (v plazmě). Pooperační stav pacientů se značně různil, od bezproblémového zotavení po akutní rejekci a reinfekci hepatitidou typu C, což jsou stavy, které se běžně při transplantaci vyskytují.

10

Při současném monitorování koncentrací π GST a α GST byla pozorována řada významných trendů. Hladiny α GST byly měřeny podle postupu, popsaného v EP A 0 640 145. Při bezproblémovém zotavování bylo možno zjistit hladiny π GST již za 2 hodiny po transplantaci, a tyto hladiny zůstaly na nízké úrovni (tzn. do 50 μ g/l). Hladiny α GST byly v důsledku reperfuze poškození zpočátku vysoké, během 2 dnů se však vrátily na výchozí úroveň, jak ukazuje obr. 5. Tento obrázek znázorňuje typický průběh hladin α GST a π GST během transplantace jater u člověka a bezprostředně po tomto výkonu. Hladiny π GST zůstávají na nízké úrovni. Rovněž bylo možno identifikovat komplikace s transplantací jater spojené. Jedním z hlavních možných problémů je akutní rejekce, nebo dokonce, což je ještě závažnější, rejekce rezistentní na steroidy. V těchto konkrétních případech bylo možno pozorovat významné zvýšení hladin π GST, které přetrvávalo po dobu několika dní, jak ukazuje obr. 6. Tento obrázek znázorňuje hladiny π GST během epizod rejekce, rezistentní vůči aplikaci steroidů (steroid resistant. SR), a během epizod akutní rejekce (AR). Hladiny jsou zvýšené a v tomto stavu zůstávají po dobu minimálně 20 dní. Hladiny α GST jsou též vysoké, vrátily se však na výchozí hodnoty během 5-8 dní.

25

Další závažné nebezpečí v souvislosti s transplantací představuje možnost infekce nebo reinfekce. Během epizod reinfekce HCV jsme dlouhodobě (tzn. minimálně 25 dní) pozorovali velmi vysoké hladiny α GST. Hladiny π GST však zůstávaly blízko normálních hodnot, jak ukazuje obr. 7. To je přesně opačná situace, než v předchozích případech při akutní rejekci. Současným provedením kvantifikace α GST a π GST lze tedy úspěšně rozlišit mezi akutní rejekcí a reinfekcí HCV, což dosud bylo velmi obtížné a představovalo terapeutické dilema pro transplantační chirurgii.

30

35 Příklad 6

Linearita ředění vzorků žluče

Od pacientů se specifickým postižením funkce jater/žlučových cest (hepatocelulární karcinom, HCC, a primární biliární cirhóza, PBC) byla získána řada vzorků žluče, a stejně tak byly získány vzorky žluče od dárců a také od pacientů po transplantaci jater. Tyto vzorky byly vyšetřeny na přítomnost lidské π GST podle protokolu v příkladu 1.

40

K titraci vzorků žluči byla použita řada standardních ředidel. Tato ředidla se rutinně používají v mnoha analytických systémech, přičemž nejčastěji používanou látkou je Tween-20. Zjistili jsme však, že přítomnost tohoto konkrétního detergentu v ředidle vzorku vedla k chybným výsledkům. Jak ukazuje tabulka 4, ve vzorcích, k jejichž ředění byla použita ředidla s obsahem Tween-20, byly pozorovány falešně vysoké koncentrace π GST, což bylo způsobeno nedostatečnou titrací. V nepřítomnosti Tween-20 probíhala titrace lineárně. Kritickým faktorem při tomto vyšetření je tedy přítomnost nebo nepřítomnost standardního reagenta Tween-20 v ředidle vzorků; při jeho použití by byly naměřeny falešně zvýšené hodnoty π GST.

50

Tabulka 4

5 Srovnání titrace vzorku žluči při PBC v ředidlech, obsahujících a neobsahujících-Tween-20. Hodnoty jsou uvedeny v $\mu\text{g/l}$

Ředění	- Tween-20	+ Tween-20
1/50	2344	3074
1/100	2374	5187
1/200	2410	7059

Lineární titrace byla pozorována pouze u ředidel, neobsahujících Tween-20.

10

Příklad 7

Srovnání polyklonálních a monoklonálních protilátek jako potahujících protilátek

15 Polyklonální a monoklonální IgG protilátky proti lidské πGST byly imobilizovány na deskách Nunc Maxisorp buď přímo, nebo pomocí vazebné látky [fragmenty F(ab)_2 kozí IgG protilátky proti látkám jiných živočišných druhů]. Pak byly použity standardy pro známé koncentrace lidské πGST , jak popsáno v příkladu 1, a při podobných koncentracích imobilizovaných IgG byly porovnány absorbance.

20

Jamky byly potaženy jak polyklonální, tak i monoklonální protilátkou, jakožto druhou (capture) protilátkou. Přímé použití polyklonálních i monoklonálních protilátek k potažení jamek mělo za následek velmi nízké hodnoty absorbance na standardní křivce (viz tab. 5). Pokud k imobilizaci byla použita vazebná protilátka (kozí IgG protilátka proti myší/králičí protilátce), byly v testu s monoklonální protilátkou získány významně zvýšené hodnoty optické hustoty (pozn. překl. v textu O.D., optical density). U polyklonální protilátky však takové zvýšení nebylo pozorováno.

25

Tabulka 5

30

Srovnání metod potahování k detekci lidské πGST

πGST	PŘÍMÉ POTAHOVÁNÍ		POTAHOVÁNÍ pomocí VAZEBNÉ PROTILÁTKY	
	polyklonální	monoklonální	polyklonální	monoklonální
100	0,625	0,421	0,352	1,557
0	0,044	0,038	0,235	0,095

35 Přímé potahování jamek protilátkou ($2 \mu\text{g/ml}$) bylo srovnáváno s potahováním pomocí vazebné protilátky (kozí protilátky proti protilátkám jiných živočišných druhů, $2 \mu\text{g/ml}$) při daných koncentracích protilátky proti πGST .

PATENTOVÉ NÁROKY

5

1. Způsob určení stavu jaterních funkcí jedince, **vyznačující se tím**, že se měří hladiny izoformy pí glutathion S-transferázy (π GST) ve vzorku biologické tekutiny tohoto jedince pomocí imunoeseje, specifické pro izoformu π GST, naměřené hladiny π GST se porovnávají s normálním rozmezím pro π GST v dané biologické tekutině a na základě změřených

10

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že jedincem je příjemce jaterního štěpu a stav jaterních funkcí je určován po transplantaci.

15

3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že jedincem je člověk.

4. Způsob podle některého předchozího nároku 1 až 3, **vyznačující se tím**, že imunoesejí je enzymoimunoesej.

20

5. Způsob podle některého předchozího nároku 1 až 4, **vyznačující se tím**, že biologickou tekutinou je žluč a normální hladiny π GST jsou nižší než 15 μ g/l.

6. Způsob podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že biologickou tekutinou je plazma a normální hladiny π GST jsou nižší než 100 μ g/l.

25

7. Způsob podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že před měřením je plazma jímána a skladována v přítomnosti antikoagulantia za podmínek, při nichž nedochází k významné hemolýze v průběhu skladování.

30

8. Způsob podle některého předchozího nároku 1 až 7, **vyznačující se tím**, že vzorek je zředěn ředidlem, obsahujícím účinné množství proteinu, které optimalizuje reakce protilátka-antigen.

35

9. Způsob podle nároku 8, **vyznačující se tím**, že proteinem je sérový albumin.

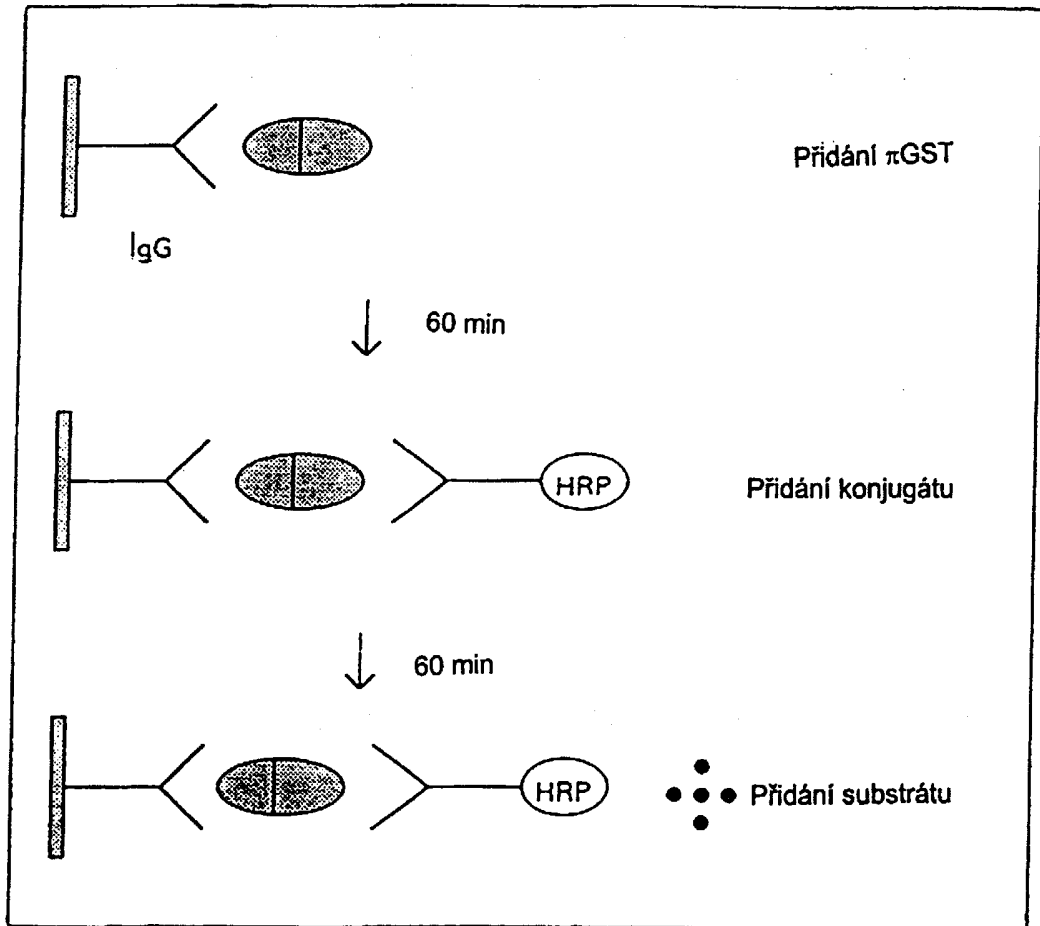
10. Způsob podle některého předchozího nároku 1 až 9, **vyznačující se tím**, že kompletní imunoesej proběhne za 2,5 hodiny.

40

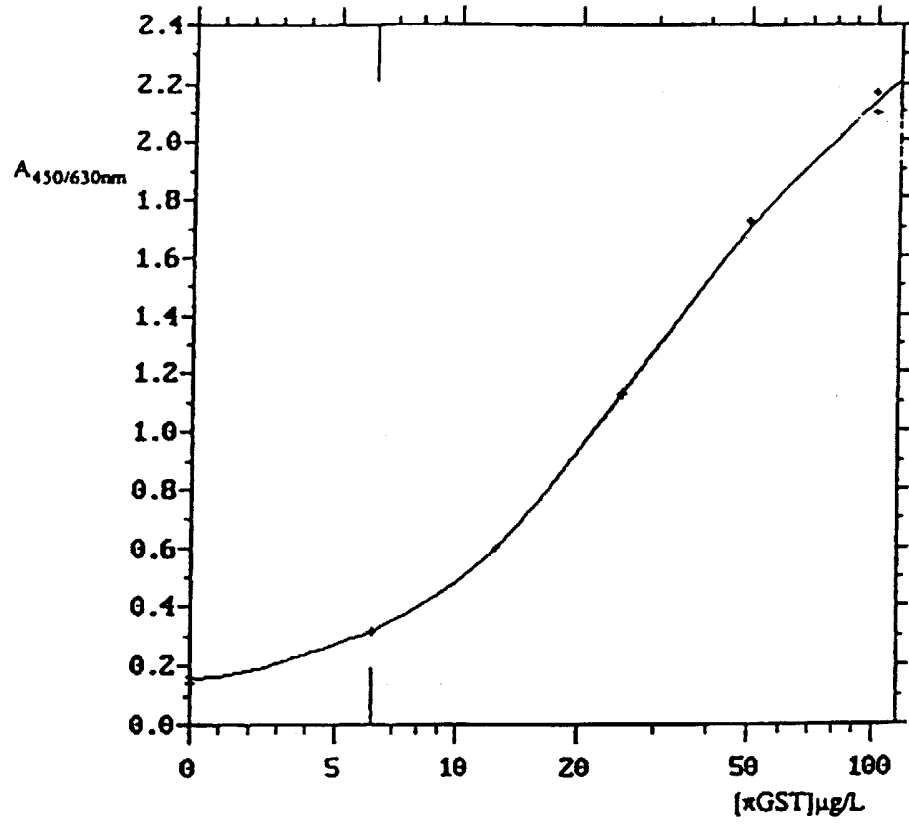
11. Způsob podle některého nároku 2 až 10, **vyznačující se tím**, že ve vzorku biologické tekutiny daného jedince se navíc měří hladina izoformy alfa glutathion S-transferázy (α GST), aby bylo usnadněno rozlišení mezi rejekcí štěpu a nespecifickým hepatocelulárním postižením daného jedince.

45

7 výkresů

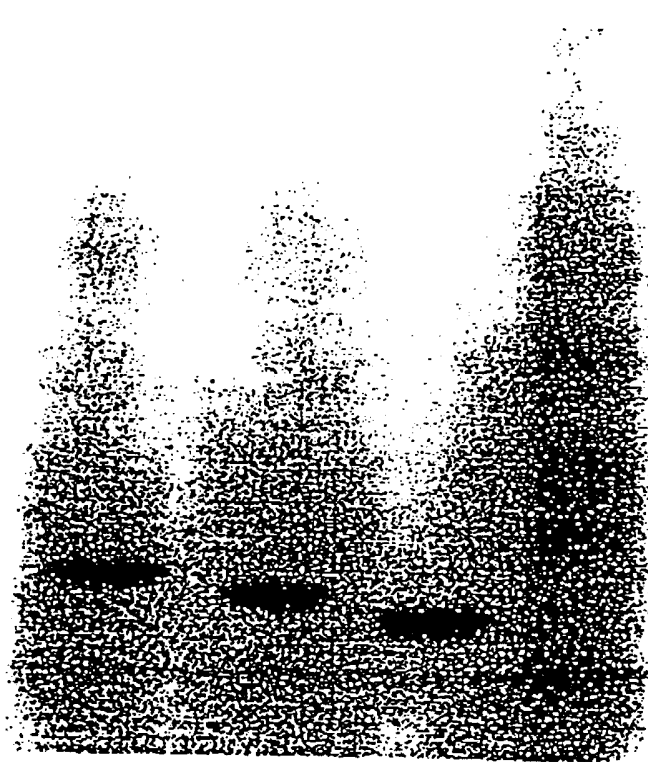


Obr. 1



Obr. 2

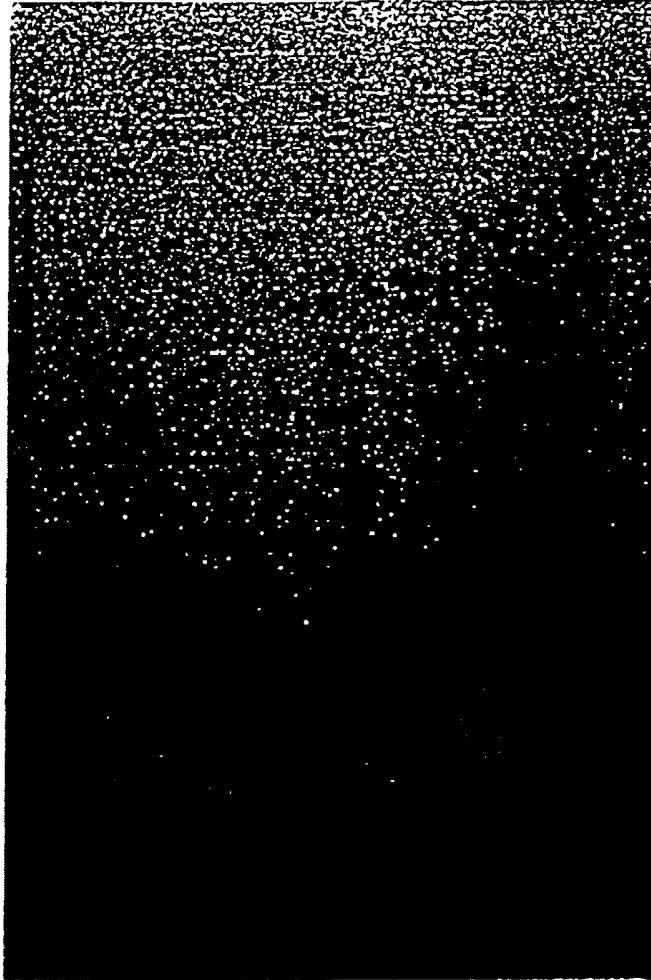
1 2 3 4



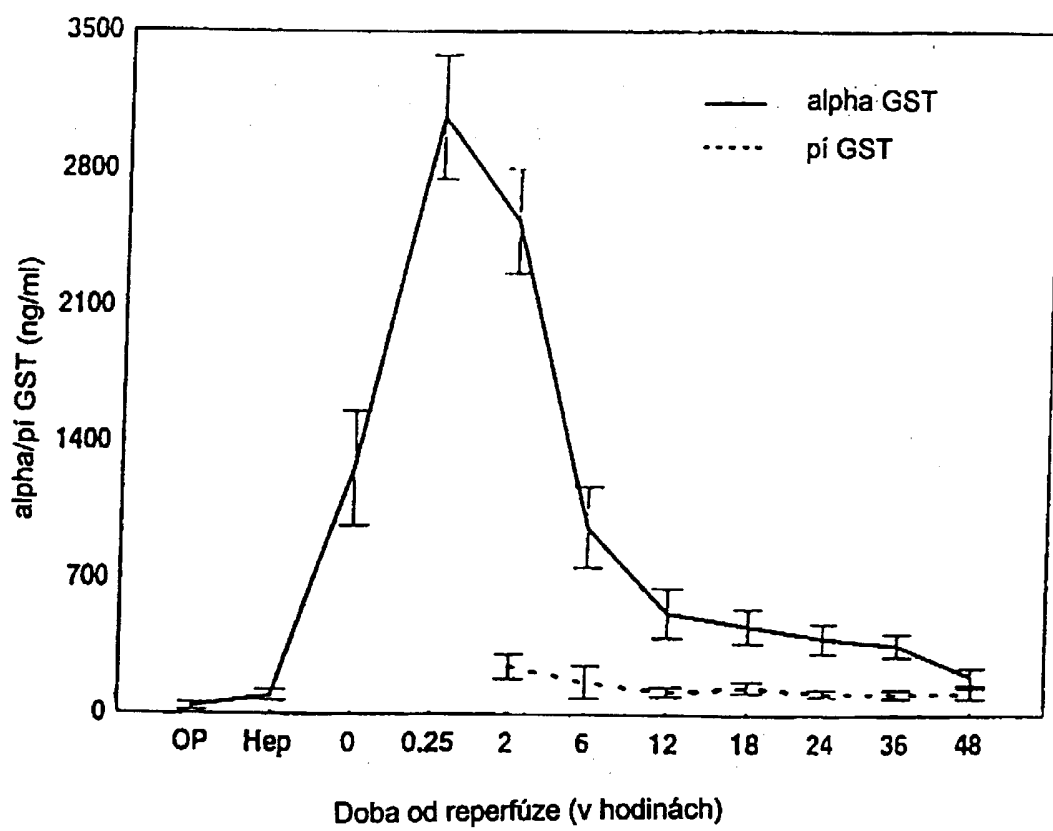
Obr. 3

1

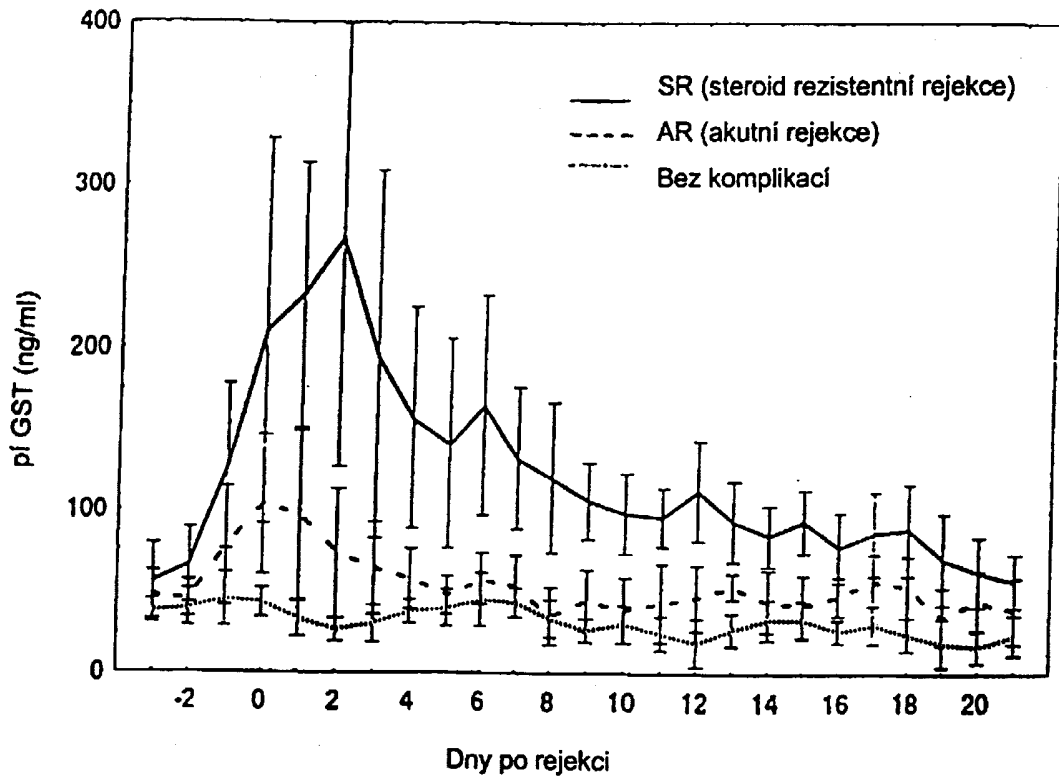
2



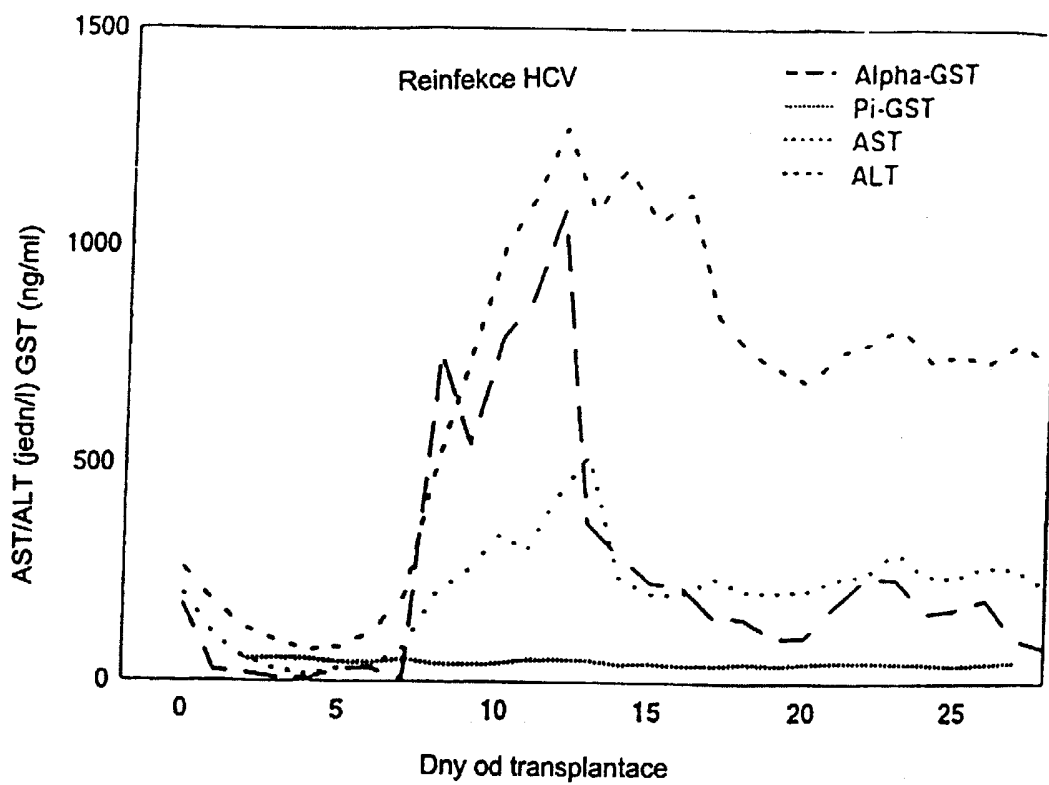
Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6



Obr. 7

Konec dokumentu
