



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

210899

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 12 11 79
(21) (PV 7701-79)

(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 získávání specifických antiimunoglobulinových protilátek s nezměněnou aviditou z hyperimunního séra

Účelem vynálezu je způsob získávání specifických antiimunoglobulinových protilátek s nezměněnou aviditou z hyperimunního séra vhodných po ozáření radioaktivním izotopem nebo enzymem k použití při radioimunoanalýze a enzymimunoanalýze.

Uvedeného účelu se dosáhne tím, že celý izolační postup probíhá v roztocích o nízké iontové síle 0,001 až 0,01. Za těchto podmínek je vazba protilátek na antigen slabá a šetrná je i uvolnění této vazby při eluci protilátek. Takto izolované protilátky se velmi osvědčují při radioimunologických a enzymimunologických metodách.

Vynález se týká způsobu získávání specifických antiimunoglobulinových protilátek s nezměněnou aviditou, které jsou vhodné k použití zejména pro nejcitlivější radioimunologické a enzymimunologické metody v humánní a veterinární diagnostice, z hyperimunních sér.

V humánní i veterinární diagnostice řady infekčních onemocnění a patologických stavů jsou stále častěji používány nové techniky založené na vysoce citlivé a specifické reakci antigenu s protilátkou. V současné době jsou používány imunofluorescenční, radioimunologické a enzymimunologické techniky, u nichž je použito protilátek nebo antigenů označených fluorescenčním barvivem, radioizotopem nebo enzymem.

Imunofluorescenční metoda je poměrně málo citlivá a obtížně hodnotitelná kvantitativně. Využívá-li označené protilátky, pak fluorescenčním barvivem bývá označena hrubě izolovaná imunoglobulinová frakce antiséra. V těchto preparátech je obsah specifických protilátek vykazujících požadovanou imunoreaktivitu nízký a velká většina označených proteinů vykazuje imunoreaktivitu mulovou nebo i nespecifickou. Radioimunologické a enzymimunologické techniky jsou extrémně citlivé a reakce se dají hodnotit kvantitativně. Na kvalitu indikátorů antigen-protilátkových reakcí, tj. na značené protilátky používané při těchto metodách, jsou však kladeny velmi přísné požadavky, protože jejich kvalita je přímo úměrná citlivosti metody i počtu vyšetření, která je možno provést.

Dosavadní postup izolace specifických protilátek navázaných na imunosorbent v roztocích o vyšší iontové síle spočívá v jejich eluci, např. pomocí 0,2 M glycinového pufru o pH 2,8 (Affinity Chromatography, Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden, 1974). Nevýhodou tohoto postupu je, že v důsledku příliš pevné vazby mezi protilátkou a antigenem navázaným na imunosorbent, dochází při izolaci k poškození molekuly protilátek a tím i k poklesu její avidity. Při dalším zpracování vypadávají dále izolované protilátky snadno z roztoku, což se projeví sníženým výtěžkem.

K odstranění shora uvedeného nedostatku směřuje způsob získávání třídově specifických antiimunoglobulinových protilátek s nezměněnou aviditou z hyperimunního séra podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že imunoglobulinová frakce, získaná z hyperimunního séra některým ze známých izolačních postupů, např. precipitací síranem amonným nebo iontoměničovou chromatografií, se dialysou nebo gelovou filtrací převede na roztok o iontové síle v rozmezí 0,001 až 0,01 a hodnotě pH v rozmezí 7,0 až 8,0, který se uvede do styku s imunosorbentem, na němž je navázán antigen, protilátky slabě vázané na antigen se z nosiče šetrně eluují roztokem o iontové síle v rozmezí 0,001 až 0,010 a hodnotě pH v rozmezí 2,5 až 3,5, nejvýhodněji 2,8 až 2,9, a získaný bílkovinný eluát se po úpravě pH na fyziologickou hodnotu převede do skladovatelné formy, např. zahuštěním nebo/a lyofilizací.

Získané protilátky rozdělené v ampulích á 0,5 až 1,0 mg je možno v lyofilizovaném stavu používat několik let. Protilátky jsou přímo použitelné k označení radioizotopem, např. ^{125}J , nebo enzymem, např. peroxidázou nebo alkalickou fosfatázou.

Uvedený způsob izolace je založen na výsledcích autorů Hardie, G. a Van Regenmortel, M. H. V., kteří v J. Immun. Meth. 5, 1977: 305 až 314 popsali izolaci specifických protilátek pomocí roztoků o nízké iontové síle z antisér proti viru tabákové mozaiky, hovězímu albuminu a lidskému gamoglobulinu. Vhodnost této metody byla v našich podmínkách ověřena a rozšířena o použití imunosorbentů CNBr Sepharose 4B (Pharmacia, Švédsko) a Insolmer (Sevac, ČSSR), o její využití k izolaci specifických protilátek proti jednotlivým třídám imunoglobulinů a o zjištění, že takto izolované specifické protilátky jsou mimořádně výhodné ke značení a použití při radioimunoanalýze a enzymimunoanalýze.

P ř í k l a d p r o v e d e n í

Výchozím substrátem pro přípravu specifických antiimunoglobulinových protilátek podle vynálezu je hyperimunní sérum imunizovaných zvířat, např. králíků.

Příprava substrátu

Králíci jsou imunizováni intradermálně na šesti místech na hřbetě emulzí ve Freundově adjuvans. Celkový objem emulze 1,2 ml, dávka antigenu 1 až 3 mg. Po uplynutí jednoho měsíce jsou podány v desetidenním intervalu 2 intramuskulární injekce antigenu v adjuvans. Následují 3 každodenní subkutánní injekce antigenu v solubilní formě. Vykrvení se provede 5. den po poslední injekci.

Zpracování substrátu

Ze 20 ml antiséra se iontoměničovou chromatografií nebo srážením síranem amonným izoluje imunoglobulinová frakce, která se zahustí na objem 10 až 20 ml a důkladně dialysuje proti deionizované vodě, jejíž pH bylo předem upraveno na 0,1 M NaOH na hodnotu 7 až 8.

Kolonka CNBr Sepharózy 4B s navázaným antigenem (2 x 10 cm) se promyje 100 až 200 ml deionizované vody o pH 7 až 8. Na kolonku se pak nanese připravený roztok imunoglobulinové frakce antiséra a nechá se protékat rychlostí 10 ml za hodinu. Po důkladném promytí kolony cca 150 až 200 ml vody o pH 7 až 8 se protilátky navázané na antigen eluují vodou, jejíž pH bylo předem upraveno 0,1 M HCl na hodnotu 2,8.

Získaný bílkovinný eluát je tvořen specifickými protilátkami proti použitému antigenu. Výtěžek je vyšší než 1 mg protilátek z 1 ml antiséra.

Eluovaný roztok se upraví na hodnotu pH 7 až 8, zahustí na potřebnou koncentraci, nadávkuje do ampulí a lyofilizuje.

Při označení takto získaných protilátek pomocí ^{125}J se běžně získává roztok, v němž je na 0,5 mg protilátek navázána aktivita 10×10^9 imp/min. Z tohoto čerstvého základního roztoku se připraví až 20 000 ml inkubačního roztoku, který postačuje pro radioimunologické vyšetření ve 400 000 mikrozkuvkách.

Při hodnocení avidity takto izolovaných specifických protilátek se používá několik metod. Při hrubé orientaci se srovnává precipitační aktivita roztoků izolovaných protilátek s aktivitou antiséra. Již roztok specifických protilátek o koncentraci 0,5 mg protilátky v 1 ml použitý při imunoelktroforéze k precipitaci antigenu vytváří dobře viditelné precipitační linie a roztok o koncentraci 1 až 2 mg protilátek v 1 ml je srovnatelný s dobrým až velmi dobrým antisérem.

Označení specifických protilátek radioaktivním izotopem, např. ^{125}J , poskytuje řadu možností jednoduchého a přesného kvantitativního hodnocení jejich avidity. Např. při inkubaci roztoku označených specifických protilátek s antigenem navázaným na imunosorbent dochází k reakci antigen-protilátka a tím k vymizení radioaktivity z roztoku. Po oddělení imunosorbentu od roztoku a určení jejich aktivit je možno přesně určit aviditu protilátek, tj. kolik procent protilátek reagovalo specificky s antigenem. Nespecifické vazbě protilátek na imunosorbent se přitom spolehlivě zabrání přidáním neaktivní bílkoviny - albuminu.

Z dosahovaných výsledků vyplývá, že zmíněný způsob izolace protilátek téměř neovlivňuje jejich aviditu. Čerstvě připravené roztoky označených protilátek dosahují aviditu až 90 %. Po 2 měsících je avidita ještě vyšší než 50 %.

V našich pokusech se roztoky ^{125}J -protilátek používají běžně déle než 6 měsíců po označení, což je s přihlédnutím na postupující radiační a chemické poškození protilátek velmi uspokojivé. V té době je jejich imunoreaktivita stále ještě vysoká a 26,6 % z celkové radioaktivity obsahuje označené protilátky precipitující s daným antigenem.

Obdobně 2 mg specifických protilátek označených peroxidázou postačují k provedení vyšetření nejméně v 50 000 mikrozkuškových. Doba použitelnosti protilátek označených enzymem je několik let. Kontrola třídové monospecificity těchto protilátek označených ^{125}J se provádí radioimunoelktroforeticky. Při této metodě je počáteční postup stejný jako při běžné imunoelktroforéze. Krevní sérum nebo kolostrum nanášené do jamek (startů) v agaru je po elktroforetickém rozdělení precipitováno antisérem proti sérovým a kolostrálním bílkovinám.

Antisérum nanášené do žlábků vytváří s jednotlivými sérovými bílkovinami precipitační linie. Kvalitní antiséra vytvářejí 15 až 20 precipitačních linií se všemi třídami imunoglobulinů i řadou dalších proteinů od makroglobulinů po albuminy. Při radioimunoelktroforéze jsou k antiséru nanášenému do jednotlivých žlábků přidána nepatrná množství ^{125}J specifických protilátek. Tyto označené protilátky se pak spoluúčastní tvorby precipitačních linií.

Jsou-li použité označené protilátky monospecifické, účastní se tvorby pouze jediné, přesně určené precipitační linie a s jinými proteinovými antigeny nereagují. To značí, že po vyprání je radioaktivita obsažena pouze v dané precipitační linii. Na vypraný imunoelktroforeogram je pak přiložen rtg film na dobu 2 až 3 dny. Linie exponované na rtg filmu přesně ukazují, se kterými proteiny označené protilátky reagují. Touto metodou byly testovány specifické protilátky proti hovězím i prasečím imunoglobulinům IgG, IgA a IgM a byla prokázána jejich vysoká monospecificita.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob získávání třídově specifických antiimunoglobulinových protilátek s nezměněnou eviditou z hyperimunního séra, spočívající v izolaci imunoglobulinové frakce z hyperimunního séra některým ze známých izolačních postupů, např. precipitací síranem amonným nebo iontoměničovou chromatografií, vyznačený tím, že imunoglobulinová frakce se dialysou nebo gelovou filtrací převede na roztok o iontové síle v rozmezí 0,001 až 0,010 a hodnotě pH v rozmezí 7,0 až 8,0, který se uvede do styku s imunosorbentem, na němž je navázán antigen, protilátky vázané na antigen se z nosiče eluují roztokem o iontové síle v rozmezí 0,001 až 0,010 a hodnotě pH v rozmezí 2,5 až 3,5, s výhodou 2,8 a získaný bílkovinný eluát se po úpravě pH na fyziologickou hodnotu převede do skladovatelné formy například zahuštěním nebo/a lyofilizací.