



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

240 831

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 26 03 84
(21) PV 2130-84

(51) Int. Cl.⁴
G 01 N 33/53

(40) Zveřejněno 16 07 85
(45) Vydáno 01 01 88

(75)
Autor vynálezu

MANČAL PETR RNDr.;
BOUZEK JAROSLAV ing.;
HRUDKOVÁ MARIE RNDr., PRAHA

(54)

Způsob přípravy imunoreagencií obsahujících protilátky

Vynález se týká způsobu přípravy imunoreagencií obsahujících protilátky, které jsou universálně použitelné pro kvalitativní a kvantitativní laboratorní techniky stanovení lidských plazmatických bílkovin v tělních tekutinách. Způsob přípravy imunoreagencií obsahujících protilátky se vyznačuje tím, že k hyperimunnímu zvířecímu antiséru se přidají solubilní antigeny až do vysycení balastních protilátek a následně se izoluje imunoglobulinová frakce opakovaným vysolováním, iontoměničovou chromatografií a následně dialýzou do prostředí o nízké iontové síle.

Vynález se týká způsobu přípravy imunoreagencií obsahujících protilátky, specifické proti lidským plazmatickým bílkovinám a přitom nevykazujících přítomnost nadbytečných antigenů, rozpustných imunokomplexů a lipoproteinů a proto vhodných pro kvalitativní i kvantitativní immunochemické diagnostické metody: imunoprecipitační techniky, radioimunoanalytické techniky, enzymoimunoanalytické techniky, aglutinační techniky, nefelometrie, turbidimetrie, histologická vyšetření.

Obecně lze tyto imunoreagencie obsahující protilátky připravit ze surových zvířecích antisér obsahujících specifické a balastní protilátky, odstraněním nežádoucích protilátek pomocí nerozpustných antigenů, vázaných obvykle na vhodný nerozpustný nosič. Tímto postupem se zajistí nepřítomnost nadbytečných antigenů používaných k odstranění balastních protilátek a rozpustných imunokomplexů. Lipoproteiny se odstraní z hyperimunních sér buď delipidačními činidly a nebo izolací imunoglobulinové frakce z vysyceného antiséra.

Příprava nerozpustných antigenů vyžaduje velmi kvalitní nosič s vysokou porezitou, aby se antigen mohl vázat nejen na povrchu partikulí gelu, ale i uvnitř partikulí. Tyto kvalitativní nároky splňuje Sepharóza 4B aktivovaná bromkyanem (bromkyanem aktivované sférické agaróзовé gelové částice), která je však velice drahá a tím obtížně dostupná. Náhrada bromkyanem aktivované Sepharózy 4B neaktivovanou Sepharózou 4B a její přímá aktivace bromkyanem je sice levnější, ale tato práce je spojena s rizikem práce s prudce jedovatým a silně těkavým jedem. Gely československé výroby Insolmer (syntetický polymer na bázi esteru aromatických kyselin), Spherony (hydrofilní makroporesní glykolmethakrylátové gely) nemají vlastnosti srovnatelné s vlastnostmi Sepharózy 4B při vyvazování bílkovin, váží antigeny pouze na svém povrchu a účinnost takto vázaného antigenu je řádově nižší než při použití rozpustných antigenů.

Odstraňování balastních protilátek insolubilními antigeny z hyperimunních zvířecích antisér je obecně zdlouhavý proces, je nutno provádět regenerace nosičů promýváním a centrifugací (energetická náročnost) a pro velkovýrobní použití je obtížné. Při tomto způsobu vysycování hyperimunních sér vzrůstají nároky na vybavení pracovišť přístroji a zařízeními, rostou požadavky na pracovní síly, dochází k omezování objemu výroby a narůstá i čas potřebný k výrobě preparátů.

Tyto vyjmenované nevýhody odpadají při použití rozpustných antigenů k odstranění balastních protilátek z hyperimunních zvířecích antisér.

Podstatou vynálezu je jednoduchý způsob přípravy immoreagencií obsahujících protilátky, který k odstranění balastních protilátek ze zvířecích hyperimunních antisér využívá přidávání solubilních antigenů až do jejich vysycení a následně izolace immunoglobulinové frakce opakovaným vysolováním, iontoměničovou chromatografií a dialýzou do prostředí o nízké iontové síle $I=0,005$ až $0,02$. Solubilní vysycovací materiály jsou před jejich použitím kontrolovány imuno elektroforeticky na přítomnost antigenu immunoglobulinu G, který při vysycovacím postupu nesmí být do antiséra vnesen v nadbytku, ale pouze do ekvivalence antigen IgG- protilátka anti IgG. V případě, že po odstranění ostatních balastních protilátek v antiséru zbývá ještě protilátka proti immunoglobulinu G, odstraní se přidáním čistého antigenu immunoglobulinu G do ekvivalence.

Cílem uvedených principů vysycování balastních protilátek z hyperimunního antiséra je kromě odstranění nežádoucích protilátek zabránění zanesení nadbytečného antigenu immunoglobulinu G do vysycovaného hyperimunního antiséra. Zanesení ostatních nadbytečných antigenů není na závadu, neboť dojde k jejich odstranění při izolaci immunoglobulinové frakce z vysyceného hyperimunního antiséra. Analytická kontrola používaných antigenů a zpracovávaných hyperimunních antisér se provádí s výhodou imuno elektroforeticky.

Při následné izolaci immunoglobulinové frakce z vysyceného hyperimunního antiséra dojde k odstranění nadbytečných antigenů použitých k vysycování balastních protilátek, lipoproteinů a rozpustných imunokomplexů, při současném zachování vysoké čistoty a výtěžnosti immunoglobulinové frakce a vysoké avidity specifických protilátek. Izolace immunoglobulinové frakce z hyperimunního antiséra představuje purifikační proces, kdy se po filtraci vysyceného hyperimunního antiséra přes čerčicí filtr (na př. Seitz K 5) opakovaným vysolením (s výhodou síranem amonným do 40% nasycení u prasečích antisér a do 45% nasycení z králíčích, kozích, ovčích, koňských, hovězích, morčecích a myších antisér) a následnou chromatografií na iontoměnič (dietylaminyetyl celulóse s výhodou na př. DEAE celulóse DE 52) při pH = 5,7 pro prasečí a 7,0 pro ostatní druhy antisér, izoluje immunoglobulinová frakce, která se následně dialyzuje do prostředí o nízké iontové síle (s výhodou proti 0,003 M monohydrofosforečnanu sodnému) a filtruje přes hustý čerčicí filtr (na př. Seitz K 5).

Tímto postupem se odstraní nadbytečné antigeny zanešené do hyperimunního séra při odstraňování balastních protilátek a také rozpustné imunokomplexy a lipoproteiny. Eventuelně přítomný nadbytečný antigen immunoglobulinu G, by se tímto krokem neodstranil.

Takto izolovaná imunoglobulinová frakce z hyperimunního antiséra se lyofilizuje a skladuje dále při teplotě $+4^{\circ}\text{C}$.

Z lyofilizované imunoglobulinové frakce se připraví sterilní roztok se standardním titrem specifických protilátek, který je použitelný jak pro klasické immunoprecipitační techniky, tak pro moderní analytické metody: radioimunoanalýzu, enzymoimunoanalýzu, nefelometrii, turbidimetrii, aglutinační techniky, histologická vyšetření a pod.

Široká škála použitelnosti imunoreagencií obsahujících protilátky připravených uvedeným způsobem je dána jejich vlastnostmi, t.j. standardním titrem specifických protilátek, absencí nadbytečných antigenů použitých k odstraňování balastních protilátek, nepřítomností rozpustných imunokomplexů a lipoproteinů.

Způsob přípravy imunoreagencií je osvětlen na následujících příkladech:

Příklad 1.

Příprava prasečí imunoglobulinové frakce proti lidskému imunoglobulinu M.

Surové hyperimunní prasečí antisérum proti lidskému imunoglobulinu M obsahuje kromě protilátky anti-IgM také nežádoucí protilátky proti alfa 2 makroglobulinu (A_2M) a imunoglobulinu G (IgG). Surové antisérum se titruje roztokem antigenu alfa 2 makroglobulinu tak, že se vždy k 1 ml surového antiséra přidá stoupající množství roztoku antigenu alfa 2 makroglobulinu a to 0,05 ml, 0,1 ml, 0,2 ml atd. Titrace se provádí za imunoelektroforetické kontroly. K surovému hyperimunnímu antiséru se přidá takové množství antigenu alfa 2 makroglobulinu, až zcela vymizí protilátka proti alfa 2 makroglobulinu. Protože roztok antigenu alfa 2 makroglobulinu obsahuje vždy 1 stopy jiných antigenů, zanáší se při vysycování protilátek proti alfa 2 makroglobulinu do surového hyperimunního antiséra nadbytečné antigeny.

Dále se provede titrace surového hyperimunního antiséra roztokem imunoglobulinu G a stanoví se optimální množství antigenu imunoglobulinu G, které je potřeba dodat k hyperimunnímu surovému antiséru, aby vymizela protilátka proti imunoglobulinu G a do antiséra nebylo zanešeno nadbytečné množství antigenu imunoglobulinu G. Titrace se provádí za imunoelektroforetické kontroly.

Po odstranění balastních protilátek ze surového hyperimunního antiséra se vysycené antisérum zfiltruje přes vrstvu Seitz K 5 a izoluje se z něj

imunoglobulinová frakce třikrát po sobě opakovaným srážením nasyceným roztokem síranu amonného do 40% nasycení. Sediment obsahující surovou imunoglobulinovou frakci se dialyzuje proti 0,03 M acetátovému tlumivému roztoku pH = 5,7 při +4°C až do vymizení pozitivní reakce na amonné ionty. Vydialyzovaná imunoglobulinová frakce se dočistí vsádkovou chromatografií na DEAE celulóse DE 52 (10 g celulósy na 1 g bílkoviny) a filtrát obsahující čistou imunoglobulinovou frakci se dialyzuje proti 0,003 M monohydrofosforečnanu sodnému (Na_2HPO_4) po dobu tří až pěti dní za výměny dialyzačního roztoku dvakrát denně. Vzniklý precipitát se odstraní filtrací přes vrstvu Seitz K 5 a filtrát se lyofilizuje.

Příprava diagnostika:

Ze získaného lyofilizátu se připraví 5% roztok prasečí imunoglobulinové frakce proti imunoglobulinu M ve fyziologickém roztoku pH = 7,2 (PBS) s 0,1% azidem sodným. Stanoví se titer specifických protilátek proti imunoglobulinu M metodou jednoduché radiální imunodifuze (modifikace Becker, W.: Immunochem. 6, 539, 1969) a koncentrace bílkoviny připraveného roztoku. Úměrou se vypočte potřebné množství lyofilizátu pro přípravu zvoleného množství diagnostika tak, aby byl dodržen standardní titer specifických protilátek, u prasečí imunoglobulinové frakce proti imunoglobulinu M je to 6,9 mg/ml. Roztok se zfiltruje přes vrstvu K 5, změří se pH. Není-li pH v rozmezí hodnot 7,2 - 7,4 upraví se buď 1 N roztokem hydroxidu sodného nebo 1 N roztokem kyseliny chlorovodíkové.

Opětovně se provede kontrola titru specifických protilátek metodou jednoduché radiální imunodifuze, výsledná hodnota se má shodovat s předem provedeným výpočtem. Není-li tomu tak roztok diagnostika se naředí nebo se přidá další lyofilizát imunoglobulinové frakce podle posledního výpočtu, opakuje se měření pH a kontrola titru specifických protilátek až je dosaženo jeho požadované hodnoty.

Roztok imunoglobulinové prasečí frakce proti imunoglobulinu M se sterilně zfiltruje nejlépe membránovým filtrem (0,22 μ) a sterilně rozplní po aliquotních množstvích do skleněných lahvíček.

Takto připravené diagnostikum má široké spektrum upotřebení. Lze jím detekovat imunoglobulin M ve všech používaných druzích kvalitativních imunoprecipitačních testů na př. Ouchterlonyho dvojité imunodifuze, imunoelektroforéze, protisměrná imunoelektroforéza.

Diagnostikum připravené výše uvedeným způsobem lze využít plně při kvantitativních imunoprecipitačních testech jako je na př. metoda jednoduché radiální

imunodifuze:

240 831

V citrát-veronal-oxalátovém pufru pH = 8,6, iontové síle I = 0,05 se rozvaří agaróze na 1% koncentraci a po schladnutí na 50°C se k roztoku přidá 0,10 ml prasečí imunoglobulinové frakce proti imunoglobulinu M na 30 ml gelu. Směs se promíchá a naleje ve vodorovné poloze na diapozitivní sklo 8,5 x 18 cm. Po zatuhnutí gelu (asi 30 minut) se zabroušenou transfuzní jehlou vykrojí startovní jamky o průměru 2 mm a aplikují se do nich standardní roztoky a vyšetřované vzorky (5x ředěné) lidských sér. Po proběhnutí 48 hodinové precipitaci při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce se destička vymyje fyziologickým roztokem, usuší se, obarví a hodnotí. Hodnoty obsahu imunoglobulinu M ve vyšetřovaných vzorcích se odečítají z kalibrační křivky sestavené jako závislost čtverce průměrů precipitačních prstenců na koncentraci standardních vzorků. Ve variantě metody jednoduché radiální imunodifuze, kdy se neředí vyšetřovaná lidská séra, se k nalití jedné imunodifuzní plotny o rozměrech 8,5 x 18 cm, t.j. 30 ml gelu, použije 0,25 ml prasečí imunoglobulinové frakce.

Pomocí diagnostika připraveného podle uvedeného způsobu lze kvantifikovat imunoglobulin M v lidských tělních tekutinách na př. metodou nefelometrickou:

Prasečí imunoglobulinová frakce proti imunoglobulinu M se naředí 100x 4% roztokem polyethylenglykolu 6000 a zfiltruje se přes čeřící vrstvu na př.

Seitz K 5. Připravený roztok se rozplní do kyvet nefelometru po 1 ml a k jednotlivým množstvím diagnostika se přidá standardní nebo vyšetřované lidské sérum.

Jednotlivé směsi roztoků se promíchají a po 30 minutách stání se změří rozptyl světla na laserovém nefelometru. Z naměřených hodnot rozptylu standardních vzorků se sestojí kalibrační křivka, na které se odečítají hodnoty obsahu imunoglobulinu M ve vyšetřovaných lidských sérech.

Detekci obsahu imunoglobulinu M lze provést i metodou terbidimetrie:

Prasečí imunoglobulinová frakce proti imunoglobulinu M se naředí 20x 4% roztokem polyethylenglykolu 6000 a zfiltruje se přes čeřící vrstvu na př. Seitz K 5. Připravený roztok se rozplní do kyvet spektrofotometru po 1 ml a k jednotlivým množstvím diagnostika se přidá standardní nebo vyšetřované lidské sérum.

Jednotlivé směsi roztoků se promíchají a nechají stát 30 minut. Měří se absorbance při 340 nm na UV spektrofotometru.

Prasečí imunoglobulinovou frakci proti imunoglobulinu M lze použít ke kvantitaci imunoglobulinu i metodou imunoenzymostanovení a radioimunostanovení.

Prasečí imunoglobulinová frakce proti imunoglobulinu M se zředí tisíckrát

0,05 M bikarbonátovým pufrům pH=9,6 a aplikuje se po 0,1 ml do jamek mikrotitračních destiček. Po proběhnutí inkubační doby (zpravidla 60 minut) se jednotlivé jamky promyjí třikrát promývacím roztokem a aplikují se standardní a vyšetřované vzorky. Po proběhnutí inkubační doby (30 až 60 minut) se jamky opět třikrát promyjí promývacím roztokem a aplikuje se značená protilátka (enzymem nebo radioizotopem). Po inkubaci 15 minut se vyvolá barevná reakce enzymu a měří se pak absorbance nebo v případě radioizotopického značení se měří přímo radioaktivita.

Z naměřených hodnot standardních vzorků se sestojí kalibrační křivka, ze které se odečítají hodnoty měřených vzorků.

Principiálně stejným způsobem jako je uvedeno na příkladu 1 lze připravovat další zvířecí imunoglobulinové frakce proti bílkovinám lidského séra na př. imunoglobulinu G, immunoglobulinu A, sekrečnímu imunoglobulinu A, C3 a C4 složce lidského komplementu, alfa 2 makroglobulinu, transferinu, fragmentu těžkého řetězce imunoglobulinu G, fragmentu lehkého řetězce imunoglobulinu G, albuminu, orosomukoidu, ceruloplazminu, prealbuminu, alfa 1 antitrypsinu, hemopexinu, haptoglobinu, sekreční komponentě, fibrinogenu, fetoproteinu, ferritinu a dalším.

Z uvedených příkladů přípravy a použití je patrna široká škála použitelnosti imunoreagencií obsahujících protilátky připravených výše uvedeným způsobem pro detekci a kvantitaci různých druhů plazmatických bílkovin. Široké spektrum použitelnosti je dáno vlastnostmi připravených diagnostik, t.j. standardním titrem specifických protilátek, nepřítomností nadbytečných antigenů, imunokomplexů a lipoproteinů.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

240 831

1. Způsob přípravy immunoreagencií obsahujících protilátky, vhodných pro imunoprecipitační techniky, radioimmoanalytické techniky, imunoenzymanalytické techniky, aglutinační techniky, nefelometrii, turbidimetrii a histologická vyšetření, vyznačující se tím, že se k hyperimunnímu zvířecímu antiséru přidávají solubilní antigeny až do vyacyení balastních protilátek a následně se izoluje imunoglobulinová frakce vysolováním, potom iontoměničovou chromatografií a následně dialýzou do prostředí o nízké iontové síle $I = 0,005$ až $0,02$.
2. Způsob přípravy immunoreagencií obsahujících protilátky podle bodu 1, vyznačující se tím, že v hyperimunním zvířecím antiséru přítomná protilátka proti imunoglobulinu G se odstraní přidáním akvivalentního množství čistého imunoglobulinu G.
3. Způsob přípravy immunoreagencií obsahujících protilátky podle bodu 1, vyznačující se tím, že se k přípravě immunoreagencií používá surové prasečí antisérum.
4. Způsob přípravy immunoreagencií obsahujících protilátky podle bodu 1 až 3, vyznačující se tím, že se dialýza provádí do prostředí v iontové síle $I = 0,015$.