



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

248769

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 9/96

(22) Přihlášeno 17 04 85

(21) PV 2836-85

(40) Zveřejněno 17 07 86

(45) Vydáno 15 12 87

(75)

Autor vynálezu

MANČAL PETR RNDr., PRAHA

(54) Způsob stabilizace konjugátů enzymů s biologicky aktivními látkami

Řešení se týká zvýšení stability konjugátů enzymů, které obsahují iont kovu ve svém aktivním centru, s biologicky aktivními látkami (např. s protilátkami), které se používají pro enzymoimunologická stanovení.

Tyto konjugáty jsou obvykle v příslušných soupravách ve velmi nízkých koncentracích a jejich stabilizace proteinovým médiem nechrání enzym před vlivem stop enzymových jedů obsažených v médiu či v obalovém materiálu. Účinek jedů stoupá s teplotou. Přidáním nadbytku organicky vázaného kovového iontu o co nejpodobnější struktuře jako má aktivní centrum enzymu se vliv jedu dělí na obě formy přítomného kovu (na přidaný komplex a na aktivní centrum), a to v poměru jejich koncentrací. Tím se výrazně zvýší doba použitelnosti a teplotní stabilita konjugátu.

Vynález řeší zvýšení stability konjugátů enzymů, které obsahují iont kovu v aktivním centru, s biologicky aktivními látkami (dále jen konjugát), např. zvýšení stability konjugátů protilátek s křenovou peroxidázou, které se běžně používají pro enzymoimunologická stanovení. Tato stanovení přítomnosti nebo koncentrací biologicky aktivních látek se běžně užívají v rutinní praxi a výzkumu řady odvětví humánní i veterinární medicíny a přírodních věd včetně zemědělských.

V současné době se ke stabilizaci používají proteinová média (např. 1 až 5% hovězí sérový albumin, normální hovězí nebo koňské sérum, želatina apod.) s přísadou vhodného konzervačního činidla bakteriostatického účinku, např. merthiolátu nebo azidu sodného.

Konjugáty pro enzymoimunoanalytické testy (např. ELISA), které jsou distribuovány v soupravách mají vzhledem ke své vysoké aktivitě velmi nízkou koncentraci (řádově mg/litr) a tím koncentraci kovu v aktivním centru řádově ug/litr. Stačí proto přítomnost i nepatrných množství látek schopných tvořit komplexy s kovy v médiu nebo obalovém materiálu, aby došlo k poškození aktivních center enzymů a tím k snížení aktivity konjugátu. Účinek těchto látek se zvyšuje s teplotou. Protože není často možné během transportu apod. zachovat předepsanou teplotu +4 °C, dochází občas (zvláště v letních měsících) ke znehodnocení těchto přípravků.

Tyto nedostatky řeší vynález. Přídavkem nadbytku komplexu organicky vázaného kovu (nejlépe stejného kovu jako obsahuje aktivní centrum enzymu) a co nejpodobnější struktury komplexu jako je struktura aktivního centra enzymu do proteinového ředícího média pro konjugát se nežádoucí účinek enzymových jedů dělí statisticky na obě formy vázaného kovu (tj. v aktivním centru enzymu a přidaném komplexu), a to v poměru jejich koncentrací. Protože přidaný komplex je v nadbytku, nedochází ke snižování enzymové aktivity v té míře, jako bez přídavku komplexu. Nelze přidat pouze anorganickou sůl kovu, tato má sama inhibiční účinky na enzym a nezvyšuje jeho stabilitu. Např. je-li enzymem nejčastěji užívaná křenová peroxidáza, jejíž aktivní centrum tvoří iont železa vázaný mezi čtyři pyrolové cykly, je ideálním komplexem pro zvýšení stability peroxidázy některé z hemových barviv, která rovněž obsahují iont železa vázaný na pyrolové cykly.

Použitím vynálezu je dosaženo podstatně vyšší stability konjugátů. Stabilizovaný konjugát vydrží zahřátý na 50 °C po dobu několika dní, zatímco konjugát bez stabilizátoru je zahřátím na tuto teplotu znehodnocen. Při 37 °C probíhá inaktivace stabilizovaného konjugátu asi 8krát pomaleji než bez stabilizátoru (platí pro křenovou peroxidázu a hem jako stabilizátor). Lze tedy takto stabilizované konjugáty přepravovat normálními dopravními prostředky i v létě a nebude docházet ke znehodnocení konjugátu, jako tomu někdy bylo v minulosti.

P ř í k l a d

Konjugát kozí protilátky proti HBsAg s křenovou peroxidázou se naředí na pracovní koncentraci 0,6 mg/litr médiem o složení M tris-HCl nárazník pH = 7,1 s 1% hovězím sérovým albumínem a 0,01% merthiolátem. Podle vynálezu se do média přidá ještě 100 mg/litr stabilizátoru hemin chloridu. Konjugát je účinný, má-li alespoň 20 % své výchozí aktivity.

Konjugát bez stabilizátoru ztratí svoji účinnost po zahřátí na 50 °C, konjugát se stabilizátorem je účinný ještě za 16 dní při této teplotě. Při 37 °C je konjugát bez stabilizátoru účinný nejvýše 8 dní, konjugát se stabilizátorem 2 měsíce.

Vynález může být použito všude tam, kde se připravují a vyrábějí konjugáty enzymů s biologicky aktivními látkami pro enzymoimunologické stanovení, tj. v různých odvětvích klinické biochemie, imunologie, endokrinologie, onkologie a ve veterinárním a humánním infekčním lékařství, rostlinné virologii atd.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob stabilizace konjugátů biologicky aktivních látek s enzymy, jejichž aktivní centrum obsahuje iont vícemocného kovu, vyznačený tím, že se jako stabilizátor přidávají organické komplexy vícemocných kovových iontů, výhodně stejných kovů, jako obsahuje aktivní centrum enzymu.