



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

225197  
(11) (B1)

[22] Prihlášené 05 05 82  
[21] [FV 3220-82]

[40] Zverejnené 27 05 83

[45] Vydané 15 04 86

[51] Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 12 N 11/16

(75)

Autor vynálezu

KUNIAK EUDOVÍT ing. CSc., ŠANDULA JOZEF RNDr. CSc., BRATISLAVA

## (54) Spôsob prípravy imunosorbentov

1

Vynález sa týka spôsobu prípravy zakotvených imunosorbentov z polysacharidov izolovaných z kvasiniek.

Hlavnou imunologicky aktívnou zložkou kvasiniek a kvasinkových mikroorganizmov sú manány, alebo manózu obsahujúce heteropolysacharidy, ako galaktomanány, glukomanány, glykurónoxylomanány, ktoré sa nachádzajú na povrchu buniek týchto mikroorganizmov. Manány patogénnych druhov rodu *Candida* sú vysokovetvené polysacharidy, ktoré majú v hlavnej refazii  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  6), v bočných refazcoch  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  2), prípadne  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  3) glykozidické väzby. Imunodominantnou skupinou týchto antigénov sú bočné refazce skladajúce sa z 5 až 6 manánových jednotiek viazaných  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  2) glykozidickými väzbami [S. Suzuki a H. Sunayama, Jap. J. Microbiol. 13, 95 (1969)].

Tieto imunologicky aktívne polysacharidy mikroorganizmov sa môžu izolovať zo živného média niekoľkonásobným zrážaním etanolom, z biomasy kvasiniek extrakciou s hydroxidom draselným o koncentrácii 2 % hmot. [P. A. J. Gorin a J. F. T. Spencer: Adv. Appl. Microbiol. 13, 15, (1970)] alebo s 0,2 mól chloridom sodným [O. Šikl a spol.: Coll. Czechoslov. Chem. Commun. 35, 2969, (1970)] pri zvýšenej teplote. Čisté manány sa získavajú následným niekoľkonásobným

2

zrážaním rozpustných polysacharidov Fehlingovým roztokom. Výťažky imunologicky aktívnych manánov sú však veľmi nízke a vzhľadom na pôvodnú biomasu nepresahujú 5 % hmot.

Keďže manány kvasinkových mikroorganizmov sú vo vode dobre rozpustné, nedajú sa preto priamo použiť na prípravu pevných sorbentov. Aby sa získali vhodné nerozpustné imunosorbenty, je potrebné polysacharidy z kvasinkovitých mikroorganizmov vhodne modifikovať sieťovaním [L. Kuniak, R. H. Marchessault, Starch 24, 110, (1972)], a to tak, aby imunodominantné skupiny polysacharidu ostali po sieťovaní zachované pre imunosorbciu špecifických protilátok z krvného séra. Molekulová hmotnosť manánov polysacharidov kvasinkovitých mikroorganizmov je relatívne nízka a pohybuje sa medzi 15 000 až 30 000 daltonov. Na jednej molekule polysacharidu sa nachádza niekoľko determinantných skupín, avšak len časť z nich sa zúčastňuje špecifickej imunologickej reakcie antigén — protilátka. [J. Šandula a M. Vojková, Folia Microbiologica, 19, 94, 1974]. Zosieťovaním manánu dochádza ešte k hustejšiemu rozloženiu determinantných skupín v makromolekule manánu, takže časť aktívnych centier imunosorbenta sa nezúčastňuje interakcie antigén — protilátka z priestorových dôvodov.

Imunologicky aktívne manány sa vyskytujú v bunkových stenách kvasiniek v komplexe s bielkovinami a imunologicky neaktívnym glukánom (C. E. Ballau, Adv. Microbiol. Phys. 14, 93, 1976). Úplné odstránenie týchto sprievodných biopolymérov naráža na ťažkosti a vyžaduje zložitý purifikačný proces. Zistili sme, že pre prípravu účinného imunosorbentu nie je potrebné manán úplne purifikovať, malé množstvo bielkoviny a glukánu nie je na závädu. Purifikačnými stupňami jednak klesá výťažok polysacharidu, klesá jeho molekulová hmotnosť, čo sťažuje účinné zosieťovanie polysacharidu a nie zanedbateľnou mierou klesá počet imunodominantných skupín schopných viazať homológne protilátky, preto je výhodnejšie použiť polysacharid len čiastočne purifikovaný s vyššou molekulovou hmotnosťou.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že polysacharid izolovaný z kvasinkovitých mikroorganizmov, s výhodou *Candida albicans* alebo *Candida tropicalis* sa v prvom stupni zosieťuje s 1-chlór-2,3-epoxipropánom v množstve 15 až 30 % hmot. na hmotnosť polysacharidu v alkalickom prostredí a v druhom stupni sa zosieťovaný polysacharidový gél podrobí vodnej dispergácii vo vysokoobrátkovom mixéri za súčasnej neutralizácie alkálií a v treťom stupni sa premyté nerozpustné polysacharidové častice odvodnia na filtri alkoholom a vysušia pri teplote do 60° Celsia.

Takto pripravený nerozpustný polysacharid s veľkosťou častíc 80 až 250 mikrónov je vhodným imunosorbentom pre izoláciu protilátok proti rôznym hubovitým ochoreniam.

Najčastejším pôvodcom mykotických ochorení u ľudí je *Candida albicans*, na ktoré pripadá vyše 80 % patologických mikrobiologických nálezov. Zbytok tvoria mikroorganizmy ako *Candida tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. fanata* a iné. Mnohé druhy *Candida* majú totožné alebo podobné antigénne zloženie ako *C. albicans*, sérologicky sú ťažko rozlíšiteľné a na mikroorganizmy tejto sérologickej skupiny pripadá až 90 % všetkých kandidóz. Vzhľadom na to, že mnohé kmene *Candida albicans* sú silno patogénne, tak ich kultivácia za účelom prípravy imunologicky aktívnych polysacharidov sa musí robiť za prísne sterilných podmienok, čo zvyšuje náklady na prípravu biomasy.

Je preto výhodné pre tieto účely použiť kmeň *Candida tropicalis*, ktorého sa priemyslovo využíva na výrobu kŕmneho droždia, je patogénny alebo len málo patogénny a navyše sa kultivuje na rôznych odpadných lignocelulózových materiáloch. Manán z *C. tropicalis* použitý ako imunosorbent zachytí protilátky séra homológneho druhu ako aj špecifické látky vytvorené mikroorganizmami voči manánom uvedenej séroskupiny.

Zakotvenie imunoaktívneho polysacharidu je výhodné prevádzať tak, že imunoaktívny

polysacharid sa rozpúšťa v hydroxide sodnom o koncentrácii 5 až 8 % hmot., tak, aby koncentrácia polysacharidu bola 15 až 30 percent hmot. a takýto roztok sa zmieša s potrebným množstvom mikrokryštalickej celulózy s veľkosťou častíc 50 až 250  $\mu\text{m}$ . Roztok sa nechá asi 1/2 hod. dobre nasiaknutý do celulózy a až potom sa pridá sietovací reagent. Sietovanie sa prevádza najprv pri teplote 20 až 30 °C, potom pri 50 °C, pri ktorej teplote sa reakcia ukončí. Pred defibráciou zosieteného gélu je výhodné pridať kyselinu octovú na neutralizáciu voľných alkálií. Bez neutralizácie by sa získali gélové častice veľmi malých rozmerov, ktoré by neboli vhodné pre prácu v kolone.

Hlavnou výhodou nového postupu je skutočnosť, že sa získa imunoaktívny sorbent s 2- až 3násobne vyšším špecifickým povrchom, t. j. zvýši sa počet aktívnych imunodominantných skupín schopných reakcie antigén-protilátka. Táto skutočnosť je významná vzhľadom na to, že izolácia i nepurifikovaného imunoaktívneho polysacharidu a nákladnejšia ako zakotvenie polysacharidu na relatívne lacnom nosiči. Ďalšou výhodou tohto postupu je to, že zakotvený imunoaktívny gél na celulózovom nosiči má lepšie reologické vlastnosti pri práci v kolone.

Ďalšie prednosti a detaily nového postupu sú zrejmé z príkladovej časti postupu, ktorá nie je vyčerpávajúca, ale len informatívna na demonštráciu podstatných znakov nového postupu prípravy zakotveného imunosorbenta vhodného na izolovanie protilátok proti mykotickým ochoreniam spôsobeným kvasinkovitými mikroorganizmami rodu *Candida*.

#### Príklad 1

10 g surového, suchého polysacharidu izolovaného z buniek kvasinkovitých mikroorganizmov *Candida tropicalis* sa zvlhčí s 20 ml destilovanej vody a nechá sa 5 až 10 min. napučiavať. Potom sa pridá 4 ml hydroxidu sodného o koncentrácii 40 % hmot., dobre sa zamieša a nechá rozpúšťať, až je roztok homogénny bez zjavných nerozpustných častíc, čo obyčajne netrvá viac ako 10 až 15 min. Do alkalického roztoku polysacharidu sa naraz pridá 10 g mikrokryštalickej celulózy o veľkosti častíc 50 až 250  $\mu\text{m}$  a dobre sa zamieša tak, aby roztok polysacharidu sa rovnomerne nasal do mikrokryštalickej celulózy, čo tvorí asi 20 až 30 min. Potom sa pridá 2 ml 1-chlór-2,3-epoxipropánu (epichlórhydrín) a dobre sa zamieša tak, aby sietovací reagent bol homogénne distribuovaný v celom objeme reakčnej zmesi. Reakčnú banku uzatvoríme a necháme reagovať pri laboratórnej teplote 1 až 2 hod., potom zvýšime teplotu postupne až na 50 °C a pri tejto teplote necháme reakčnú zmes reagovať 1 hod., načo zosietený polysacharidový gél mixujeme vo vode

[do ktorej sa pridá kyselina octová na neutralizáciu voľných alkálií] asi 30 až 60 s v rýchloobrátkovom mixéri. Nerozpustný zakotvený polysacharidový gél sa niekoľkonásobne dekantuje od najjemnejších podielov, ktoré by veľmi zvyšovali odpor pri práci na kolóne. Dekantované a dokonalé premyté gélové častice sa na filtri postupne odvodnia alkoholom, resp. acetónom a vysušia pri teplote do 60 °C. Napúšťací objem pripraveného zakotveného imunosorbenta je okolo 6 až 7 ml/g a je vhodný pre imunosorbciu protilátok z biologických tekutín.

#### Príklad 2

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že na sieťovanie použijeme 4 ml epichlorhydrínu a rozpustný polysacharid zakotvíme na 30 g mikrokryštalickej celulózy. Vlastnosti získaného zakotveného imunolo-

gicky aktívneho polysacharidového gélu sú podobné ako u príkladu 1.

#### Príklad 3

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že ako imunologicky aktívny polysacharid sa použije polysacharid izolovaný z mikroorganizmu *Candida albicans*. Zosietený, zakotvený polysacharid má obdobné vlastnosti ako zosietený polysacharid izolovaný z *Candida tropicalis*.

Popísaná metóda prípravy imunosorbentov z mikrobiálnych polysacharidov je univerzálna, môže byť použitá nielen pre kandidy, ale pre ľubovoľné imunologicky aktívne polysacharidy.

Vynález má použitie v zdravotníctve pri dôkaze, izolácii a purifikácii účinných protilátok z biologického materiálu pri mykotických ochoreniach ako i v alergológii.

### PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob prípravy imunosorbentov z polysacharidov izolovaných z kvasiniek vyznačený tým, že polysacharid izolovaný z kvasinovitých mikroorganizmov, s výhodou druhu *Candida albicans* alebo *Candida tropicalis* sa v prvom stupni zosieťuje s 1-chlór-2,3-epoxipropánom v množstve 15 až 30 % hmot. na hmotnosť polysacharidu v alka-

lickom prostredí a v druhom stupni sa zosietený polysacharidový gél podrobí vodnej dispergácii vo vysokoobrátkovom mixéri za súčasnej neutralizácie voľných alkálií a v treťom stupni sa premyté nerozpustné polysacharidové častice odvodnia na filtri alkoholom a vysušia pri teplote do 60 °C.