



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU 268 052

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(21) PV 7047-85
(22) Přihlášeno 03.04.86

(40) Zveřejněno 14.08.89
(45) Vydáno 31.07.90

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
G 01 N 33/86

(75)

Autor vynálezu KOŘÍNEK JAROSLAV, Praha

(54)

Způsob výroby diagnostického přípravku ke
stanovení α_1 - antitrypsinu

(57) Způsob výroby diagnostického přípravku ke stanovení α_1 - antitrypsinu v biologickém materiálu na známém principu imunizace zvířat, vyznačený purifikací imunogénu působením jednoho až čtyř hmotnostních dílů zvířecího imunoglobulinu na jeden hmotnostní díl lyofilizovaného lidského α_1 - antitrypsinu, získaného z lidského séra dvojím srážením balastních sérových bílkovin pevným síranem amonným při koncentraci 400 g síranu amonného na 1 litr roztoku lidských sérových bílkovin. Zvířecí imunoglobulin protilátkově aktivní proti minoritním komponentům lidské α_1 - globulinové frakce se vyrobí imunizací zvířete surovým nepurifikovaným lidským α_1 - antitrypsinem a upraví se vysycením, tj. přidávkou purifikovaného lidského α_1 - antitrypsinu k antiséru, tak, aby antisérum neprecipitovalo α_1 - antitrypsin, ale aby precipitovalo minoritní α_1 - globulinové frakce. Směs obou lyofilizátů, tj. α_1 - antitrypsinu a imunoglobulinu proti minoritním komponentům se rozpustí v 0,06 M fosfátovém nárazníku, profiltruje vrstvou dietylaminoethylcelulózy při pH 6,8 a α_1 - antitrypsin se oddělí od volné protilátky a od komplexů v rozmezí molarity 0,06 M - 0,3 M, čímž se zbaví minoritních komponentů, které rozhodují o hospodárnosti výroby. Imunizace prasat purifikovaným lidským α_1 - antitrypsinem se provede ve třech až pěti dávkách, injekcí po 5 ml aluminohydroxidové suspenze, vpichuje se 0,02% až 1% roztok α_1 - antitrypsinu pětikrát ředěný suspenzí, imunizace koz

se provádí kontinuálně po delší časová období v menších dávkách, úměrných hmotnosti zvířete. K séru imunizovaných zvířat se přidá albumin, orosomukoid, nebo jiná frakce lidského séra, a produkt se izoluje.

Vynález uvádí způsob výroby diagnostického přípravku ke stanovení α_1 - antitrypsinu v biologickém materiálu, u kterého se řeší dosažení požadované specifické diagnostiky purifikací antitrypsinového imunogénu a úpravou diagnostického séra se zřetelem k minoritním komponentům α_1 - globulinové frakce séra. Tyto minoritní komponenty lidského séra kontaminují preparáty α_1 - antitrypsinu, jsou obtížně prokazatelné a odstranitelné, avšak uplatňují se rozhodujícím způsobem v ekonomice výrobního procesu a v kvalitě antitrypsinového diagnostika.

V současné době produkuje diagnostický přípravek několik předních světových výrobců. Z analýz komerčních diagnostik, provedených v Ústavu sér a očkovacích látek v Praze (odbor imunochemie) vyplývá, že pouze přípravek jednoho výrobce /DAKOPATTS, Dánsko/ splňuje požadavek monospecifity. Ostatní analyzované komerční preparáty, ač deklarovány jako monospecifické, dávají v imunoelektroforéze ještě nežádoucí vedlejší nespecifickou reakci s neidentifikovaným minoritním proteinem, viditelným v α_1 - frakci jako samostatný precipitační oblouček. Problematiku odstranění minoritních složek z α_1 - antitrypsinu uvádí odborná literatura /Piero Musiani and Thomas B. Thomas, Jr.: Isolation, chemical, and physical properties of α_1 - antitrypsin. Biochemistry, 15, 798 (1976)/.

V ČSSR byl způsob výroby antitrypsinového diagnostika předmětem několikaletého výzkumu, posouzen oponenty a uveden do praxe. Brzy po zahájení výroby se ukázalo, že nelze diagnostikum nadále vyrábět pro neodstranitelné nespecifity, velmi slabý titr protilátek a velký počet neúspěšně imunizovaných zvířat. Byl proto vyhlášen podnikový tematický úkol č. 3/81 "Zvýšení hospodárnosti, produktivity a produkce prasečího antiséra α_1 - antitrypsin", jehož řešitelem je autor tohoto vynálezu.

Podstatou vynálezu je způsob výroby α_1 - antitrypsinového diagnostika, založeného na známém principu imunizace produkčních zvířat, vyznačující se tím, že na jeden hmotnostní díl lyofilizovaného lidského α_1 - antitrypsinu se působí jedním až čtyřmi díly zvířecího imunoglobulinu protilátkově aktivního proti minoritním komponentům α_1 - globulinové frakce lidského séra, roztok obou bílkovin v 0,06 M fosfátovém nárazníku pH 6,8 se profiltruje vrstvou dietylaminoethylcelulózy, jímají se vytékající frakce, frakce α_1 - antitrypsinu eluovaná ze sloupce v rozmezí 0,06 až 0,3 M fosfátového nárazníku se potom injikuje produkčním zvířatům (králíkům, kozám, prasatům, ovčím, nebo jiným zvířatům) v dávkách 0,2 ml až 5 ml v koncentraci 0,02 % až 1 % antitrypsinu, a to ve 3 až 5 injekcích pro 1 zvíře. K séru imunizovaných zvířat se potom přidá albumin, orosomukoid, nebo jiná frakce lidského séra za účelem odstranění (vysycení) průvodních nežádoucích protilátek, které imunizační postup prakticky vždy provázejí. Po vysycení se produkt izoluje buď v podobě antiséra, nebo se z antiséra izoluje imunoglobulin, popřípadě specifická protilátka. Zvířecí imunoglobulin protilátkově aktivní proti minoritním komponentům lidské α_1 - globulinové frakce séra se vyrobit tak, že produkčnímu zvířeti stejného živočišného druhu použitému k výrobě diagnostika, se vpichuje surový lidský α_1 - antitrypsin, alternativně i rozpustná síranová frakce lidského séra sraženého síranem amonným při 40% nasycení, a to nejméně ve 3 až 5 injekcích k dosažení co nejvyššího titru protilátek. Za 6 až 10 dnů po poslední injekci se získá zvířecí serum, ke kterému se přidá co nejmenší množství lidského α_1 - antitrypsinu, právě postačující k odstranění protilátek proti α_1 - antitrypsinu, přičemž ostatní protilátky v antiséru zůstávají nevysyceny. Přítomnost jakýchkoli jiných protilátek v antiséru - jiných, než antitrypsinových - není na závadu. Z takto vysyceného antiséra se připraví imunoglobulin, jakýmkoli vhodným způsobem, například vysrážením 2M síranem amonným. Izolovaný protilátkový imunoglobulin proti minoritním komponentům α_1 - globulinové frakce séra se potom dialyzuje a lyofilizuje. K oddělení volné protilátky od rozpustných antigen-protilátkových komplexů dojde v největší míře v dalším purifikačním stupni ve vrstvě dietylaminoethylcelulózy, jak již bylo uvedeno.

Vynález řeší zvláště obtížný technologický problém, mající rozhodující význam pro použitelnost α_1 - antitrypsinového diagnostika v kvalitativní i kvantitativní imunodiagnostice. Preparáty α_1 - antitrypsinu obsahují vždy 3 až 4 stopové minoritní komponenty v oblasti α_2 - až α_1 - frakce séra, které jsou velmi nebezpečné pro zdar výroby: jsou obtížně prokazatelné přímou imunoprecipitací, avšak injikovány zvířatům, navozují u zvířat precipitující protilátky. Tyto protilátky jsou na rozdíl od "benigních" protilátek, jako je albumin, orosomukoid a většina ostatních bílkovin, "maligní", protože jsou neodstranitelné, čímž zabraňují dosažení požadované specifickosti diagnostika. Konečným důsledkem je pak výrobek neprodejný, nepoužitelný k specifickým kvalitativním a kvantitativním analýzám, což vede k hospodářským ztrátám. Důvodem neodstranitelnosti minoritních protilátek je absence minoritních proteinů v dostupných frakcích lidského séra, vhodných k úpravě (vysycení) diagnostika.

Způsob výroby diagnostika podle vynálezu vede u imunizovaných zvířat ke vzniku antitrypsinových protilátek s dobrou reprodukovatelností výrobních cyklů. Zvířecí protilátka proti minoritním komponentům je použita v purifikačním stupni preparace imunogénu ve volném, nevázaném stavu, neovlivněném vazbou na pevný nosič. Má proto i větší vazebnou kapacitu, lze ji dobře dávkovat a kontrolovat její účinnost. Protilátkou vázané nežádoucí kontaminanty se spolu s nadbytkem nevyvázané protilátky odstraní přímo v purifikačním stupni, což je nemalou výhodou, protože namísto α_1 - antitrypsinu lze použít k přípravě imunogénu celkem jednoduše připravenou rozpustnou síranovou frakci lidského séra, získanou při 40% nasycení síranem amonným. Průvodní orosomukoid a albumin sice navodí u imunizovaných zvířat precipitační protilátky, ale ty lze snadno odstranit vysycováním antiséra; navíc tyto frakce mají značný stabilizační vliv a omezují denaturaci antitrypsinu, ke které jinak ve značné míře dochází. Oproti protilátce fixované na pevný nosič (například na CN Br/sepharózu) je volná protilátka použitelná v průmyslovém měřítku s minimálními náklady. Vynález dosahuje zjednodušením preparace imunogénu, vysokou produktivitou a dobrou reprodukovatelností výroby nového a vyššího účinku v současné etapě způsobu výroby antitrypsinového diagnostika.

Příklad 1

Nepurifikovaný, surový α_1 - antitrypsin se vyrobí tak, že k 1 litru smíšeného séra (odpadního, tak zvaného sběrového) se přilije 1 litr 0,15 M chloridu sodného a ve směsi se rozpustí pevný síran amonný v hmotnostním množství 800 g. Sraženina se odcentrifuguje, filtruje se supernatantní tekutina přes mikrobiologický filtr, dialýzuje proti destilované vodě a lyofilizuje se. Tato lyofilizovaná frakce slouží jednak jako imunogén k získání protilátek proti minoritním frakcím séra, jednak jako základ k výrobě čistého imunogénu.

Příklad 2

Částečně purifikovaný α_1 - antitrypsin se vyrobí tak, že 2,5% roztok surového α_1 - antitrypsinu z příkladu 1, rozpuštěný v 0,05 M fosfátu pH 6,8 se sráží síranem amonným postupem shodným s příkladem 1. Lyofilizací a rozpuštěním se získá roztok antitrypsinu, vhodný k přípravě imunogénu, purifikovaného protilátkou proti minoritním komponentům.

Příklad 3

Imunoglobulin protilátkově aktivní proti minoritním komponentům α_1 - globulinové frakce séra byl získán tak, že produkční zvíře - prase - bylo injikováno 4x v intervalech tří týdnů nepurifikovaným, surovým α_1 - antitrypsinem z příkladu 1, přičemž každá imunizační dávka obsahovala 20 mg frakce z příkladu 1. Za 3 týdny po čtvrté injekci byl k séru imunizovaného zvířete přidán purifikovaný lidský α_1 - antitrypsin v hmotnostním množství právě postačujícím k odstranění protilátek proti α_1 - antitrypsinu, a z antiséra byl vysolen imunoglobulin 2M síranem amonným, sraženina rozpuštěna, dialyzována a lyofilizována.

Příklad 4

K 0,5 g lyofilizovaného lidského α_1 - antitrypsinu podle příkl.2 byl přidán 1 g lyofilizovaného prasečího imunoglobulinu proti minoritním komponentům α_1 - globulinové frakce lidského séra, směs rozpuštěna v 50 ml 0,06 M fosfátového nárazníku pH 6,8 a profiltrována vrstvou dietylaminoethylcelulózy, frakce purifikovaného α_1 - antitrypsinu eluována z vrstvy při zvýšené molaritě nárazníku v rozmezí 0,06M až 0,3M. Frakce obsahující α_1 - antitrypsin byla potom použita jako imunogén k injekci zvířat.

Příklad 5

Injekce prasat byla prováděna ve třech injekcích po 3 týdnech po 5 ml aluminiumhydroxidové suspenze (Al-Span) obsahující 0,1 mg až 0,3 mg purifikovaného α_1 - antitrypsinu z příkladu 4, poslední injekce obsahovala 10 mg imunogénu (čtvrtá injekce). Za týden až 10 dnů byla získána antiséra, vysycena přidavkem roztoku lidského albuminu a individuálně podle imunoalektroforetického spektra orosomukoidovou, nebo i jinou frakci lidského séra za účelem dosažení požadované specifčnosti produktu.

Příklad 6

Injekce koz byla prováděna kontinuálně po dlouhá časová období vpíchnutím (po poradě s veterinářem) minimálního objemu emulze z příkladu 5, který zpravidla nepřevyšoval 2 až 3 ml. Podle zdravotního stavu zvířete byly potom prováděny odběry krve a při pozorovatelném poklesu titru protilátek bylo zvíře reimunizováno. Vysycení antiséra prováděno analogicky.

P R Ě D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob výroby diagnostického přípravku ke stanovení α_1 - antitrypsinu na principu imunizace zvířat, vyznačující se tím, že na jeden hmotnostní díl lidského α_1 - antitrypsinu se působí jedním až čtyřmi díly zvířecího imunoglobulinu protilátkově aktivního proti minoritním komponentům α_1 - globulinové frakce lidského séra, roztok obou bílkovin se profiltruje vrstvou dietylaminoethylcelulózy, frakce α_1 - antitrypsinu se vpichuje jako 0,02 až 1% roztok v dávkách 0,2 ml až 5 ml ve čtyřech nebo více injekcích králíku, koze, praseti, ovci, nebo jinému zvířeti, k séru imunizovaných zvířat se přidá albumin, orosomukoid, nebo jiná frakce lidského séra, a získaný produkt se izoluje.