



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

240749

(11)

(B1)

[51] Int. Cl.⁴
G 01 N 33/53

[22] Přihlášeno 14 12 84
[21] (P^č 9752-84)

[40] Zveřejněno 16 07 85

[45] Vydáno 15 08 87

[75]

Autor vynálezu

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

[54] Způsob přípravy imunoreagencií obsahujících protilátky

1

2

Řešení se týká způsobu přípravy imunoreagencií obsahujících protilátky, které jsou univerzálně použitelné pro kvantitativní a kvalitativní laboratorní techniky stanovení lidských plazmatických bílkovin v tělních tekutinách.

Způsob přípravy imunoreagencií obsahujících protilátky se vyznačuje tím, že k hyperimunnímu zvířecímu antiséru se přidají glutaraldehydem polymerované antigeny k 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 imunochemické 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 způsobem se zajistí nepřítomnost nadbytečných antigenů používaných k odstranění balastních protilátek a rozpustných imunokomplexů. Lipoproteiny se odstraní z hyperimunních antisér buď delipidačními činidly, nebo izolací imunoglobulinové frakce z vysyceného antiséra.

Příprava nerozpustných antigenů vyžaduje velmi kvalitní nosič s vysokou porézitou, aby se antigen mohl vázat nejen na povrch partikulí gelu, ale i uvnitř partikulí. Tyto kvalitativní nároky splňuje nosič Sepharóza 4B aktivovaná bromkyanem (bromkyanem aktivované sférické agarózové gelové částice), která je však velice drahá a tím obtížně dostupná (dovoz). Náhrada bromkyanem aktivované Sepharózy 4B neaktivovanou Sepharózou a její přímá aktivace bromkyanem je sice levnější, ale tyto práce jsou spojeny s rizikem práce s prudce 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 převážně pouze na svém povrchu a účinnost takto vázaného antigenu je řádově nižší než při použití polymerizovaných antigenů.

Odstraňování balastních protilátek insolubilními antigeny z hyperimunních zvířecích imunních antisér je obecně zdoluhavý proces, je nutno provádět regenerace nosičů promýváním a centrifugací (energetické nároky) a pro velkovýrobní použití je nevýhodné a obtížné. Při tomto způsobu vysycování balastních protilátek z hyperimunních zvířecích antisér 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 antigenů polymerizovaných glutaraldehydem u těch druhů hyperimunních zvířecích antisér, kde z důvodu obtížnosti či nemožnosti přípravy vhodné kombinace

rozpustných antigenů nelze tuto formu odstraňování balastních protilátek použít (AO č. 240 831).

Podstatou vynálezu je tedy způsob přípravy imunoreagencií obsahujících protilátky, vhodných pro imunoprecipitační techniky, radioimunoanalytické techniky, imunoenzymoanalytické techniky, aglutinační techniky, nefelometrii, turbidimetrii a histologická vyšetření, vyznačující se tím, že k hyperimunnímu zvířecímu antiséru se přidají antigeny v polymerované formě až do vysycení balastních protilátek a následně se izoluje imunoglobulinová frakce vysolováním a potom iontoměřičovou chromatografií a následně dialýzou do prostředí o nízké iontové síle $I = 0,05$ až $0,2$.

Způsob přípravy imunoreagencií se vyznačuje tím, že příslušný antigen použitý k odstranění balastních protilátek se polymerizuje glutaraldehydem a vysycené antisérum se sráží opakovaně síranem amonijným do 45 %, dialýza se provádí do prostředí o iontové síle $I = 0,15$.

Cílem uvedeného postupu je kromě odstranění nežádoucích protilátek z hyperimunních zvířecích antisér zabránění zanesení nadbytečného imunoglobulinu G do vysyceného hyperimunního antiséra, zanesení ostatních nadbytečných antigenů není na závadu, neboť dojde k jejich odstranění při izolaci imunoglobulinové frakce.

Protilátka proti imunoglobulinu G, případně další protilátky, se při aplikaci polymerizované směsi antigenů neodstraní, a kde antigeny k těmto protilátkám jsou izolovatelné buď jednotlivě, nebo ve vhodné směsi, se odstraní v poslední fázi vysycovacího procesu přidáváním ekvivalentního množství solubilního čistého imunoglobulinu G, případně solubilních jednotlivých nebo směsných antigenů, odpovídajících zbylým balastním protilátkám.

Analytická kontrola používaných antigenů a zpracovávaných hyperimunních antisér se provádí s výhodou imunoelektroreticky. Při následné izolaci imunoglobulinové 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 imunoglobulinové frakce a vysoké avidity specifických protilátek. Izolace imunoglobulinové frakce a příprava diagnostika, tj. zvířecí imunoglobulinové frakce proti příslušné lidské bílkovině se provádí opakovaným vysolováním, iontoměřičovou chromatografií a dialýzou do prostředí o nízké iontové síle $I = 0,05$ až $0,20$.

Příklad 1

Příprava prasečí imunoglobulinové frakce proti lidskému imunoglobulinu D.

Surové hyperimunní antisérum proti lidskému imunoglobulinu D obsahuje kromě protilátek proti imunoglobulinu D nežádoucí protilátky proti imunoglobulinu A, imunoglobulinu G, imunoglobulinu M, alfa 2 makroglobulinu a dalším neidentifikovatelným bílkovinám. Surové hyperimunní antisérum se titruje lidským sérem normálním (imunoelktroforeticky je zjištěna nepřítomnost imunoglobulinu D v použitém lidském séru normálním) tak, že vždy k 1 ml surového antiséra se přidá stoupající množství lidského séra normálního: 0,05 ml, 0,10 mililitrů, 0,15 ml atd. Titrace se provádí za imunoelktroforetické kontroly. K surovému hyperimunnímu séru se přidá takové množství lidského séra normálního, aby byla odstraněna většina nežádoucích protilátek, ale aby v antiséru zbyla velmi slabá protilátka proti imunoglobulinu G. Obvykle zbývá ještě několik dalších protilátek proti neidentifikovatelným bílkovinám. Připraví se imunosorbent polymerací lidského séra glutaraldehydem (na 100 ml lidského séra normálního se použije 2 ml 25% glutaraldehydu). Tento imunosorbent se použije v nadbytku k odstranění všech zbývajících balastních protilátek v antiséru včetně zbylých protilátek proti imunoglobulinu G.

Vysycování opět probíhá za imunoelktrické 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. Vydiaľyzovaná imunoglobulinová frakce se dočistí vsádkovou chromatografií na DEAE celulóse DE 52 (10 gramů celulósy na 1 gram bílkoviny) a filtrát obsahující jen čistou imunoglobulinovou frakci se vydiaľzuje 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 K 5 a filtrát se lyofilizuje.

Příprava diagnostika:

Ze získaného lyofilizátu se připraví 5% roztok imunoglobulinové frakce proti imunoglobulinu D ve fyziologickém roztoku pH = 7,2 s 0,1% azidem sodným (PBS). Stanoví se titr specifických protilátek proti imunoglobulinu D metodou jednoduché radiální imunodifúze (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 titr specifických

protilátek, u prasečí imunoglobulinové frakce proti lidskému imunoglobulinu D je to 1,9 mg/ml.

Roztok se zfiltruje přes vrstvu Seitz 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. Opět se provede kontrola titru specifických protilátek metodou jednoduché radiální imunodifúze, 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 prasečí imunoglobulinové frakce proti imunoglobulinu D se sterilně zfiltruje nejlépe membránovým filtrem (0,22 μ) a sterilně se rozplní po alikvotních množstvích do skleněných lahviček.

Takto připravené diagnostikum má široké spektrum upotřebení. Lze jím detekovat imunoglobulin D ve všech používaných druzích kvalitativních imunoprecipitačních testů např. Ouchterlonyho dvojítá imunodifúze, imunoelktroforéza, protisměrná imunoelktroforéza. Diagnostikum připravené výše uvedeným způsobem lze využít plně při kvantitativních imunoprecipitačních testech jako je např. metoda jednoduché radiální imunodifúze:

V citrát-veronal-oxalátovém pufru pH = 8,6, iontové síle I = 0,05 se rozvaří agaróza na 1% koncentraci a po zchladnutí na 50 °C se k roztoku přidá 0,08 prasečí imunoglobulinové frakce proti imunoglobulinu D na 30 ml gelu. Směs se promíchá a naleje ve vodorovné poloze na skleněné dia-pozitivní sklo 8,5 × 18 cm. Po zatuhnutí gelu (asi 30 minut) se zabroušenou transfúzní jehlou vykrojí startovní jamky o průměru 2 mm a aplikují se do nich standardní roztoky a 2krát ředěné vyšetřované vzorky lidských sér.

Po proběhnutí precipitace (48 hodin) při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce se destička vymyje fyziologickým roztokem, usuší se, obarví a hodnotí. Hodnoty obsahu imunoglobulinu D ve vyšetřovaných vzorcích se odečítají z kalibrační křivky sestavené jako závislost čtverce průměrů precipitačních prstenců na koncentraci standardních vzorků. Ve variantě metody jednoduché radiální imunodifúze, kdy se neředí vyšetřovaná lidská séra se k nalití jedné imunodifúzní plotny o rozměrech 8,5 × 18 cm, tj. 30 ml gelu použije 0,30 ml prasečí imunoglobulinové frakce proti imunoglobulinu D.

Pomocí diagnostika připraveného podle uvedeného způsobu lze kvantifikovat imunoglobulin D v lidských tělních tekutinách např. metodou nefelometrickou:

Prasečí imunoglobulinová frakce proti

imunoglobulinu D se naředí $100 \times 4\%$ roztokem polyethylenglykolu 6 000 a zfiltruje se přes čerčící filtr např. Seitz K 5. Připravený roztok se rozplní do kyvet nefelometru po 1 ml a k jednotlivým množstvím diagnostika se přidá standardní nebo vyšetřované sérum lidské.

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

Detekci obsahu imunoglobulinu D při použití zvířecí imunoglobulinové frakce proti imunoglobulinu D lze provádět i metodou turbidimetrie:

Prasečí imunoglobulinová frakce proti imunoglobulinu D se naředí 20krát 4% roztokem polyethylenglykolu 6 000 a zfiltruje se přes čerčící vrstvu např. 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 se stát 30 minut. Měří se absorbance při 340 nm na UV spektrofotometru.

Prasečí imunoglobulinovou frakci proti lidskému imunoglobulinu D lze použít ke kvantitaci metodou imunoenzymostanovení a radioimunostanovení i když z důvodu poměrně výše obsahu imunoglobulinu D v lidských tělních tekutinách (v lidském séru normálním přibližně 100 mezinárodních jednotek v 1 ml) se tyto metody běžně v laboratorní praxi nepoužívají.

Principiálně stejným způsobem jako je uvedeno v příkladu 1, lze připravovat další zvířecí imunoglobulinové frakce proti bílkovinám lidského séra například imunoglobulinu E, D a E štěpu fibrinogenu, beta 2 mikroglobulinu, Bence-Jonesovým bílkovinám typu K a L, alfa 2 AP glykoproteinu, beta subjednotce choriového gonadotropinu, ferritinu a dalším.

Z uvedených příkladů přípravy a použití je patrná 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, tj. standardním titrem specifických protilátek, nepřítomností nadbytečných antigenů, rozpustných imunokomplexů a lipoproteinů.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob přípravy imunoreagencií obsahujících protilátky, vhodných pro imunoprecipitační techniky, radioimunoanalytické techniky, imunoenzymoanalytické techniky, aglutinační techniky, nefelometrii, turbidimetrii a histologická vyšetření, vyznačující se tím, že k hyperimunnímu zvířecímu antiséru se přidají antigeny v polymerované formě až do vysycení balastních protilátek a následně se izoluje imunoglobulinová frakce vysolováním a potom ion-

toměničovou chromatografií a následně dialýzou do prostředí o nízké iontové síle — $I = 0,05$ až $0,2$.

2. Způsob přípravy imunoreagencií podle bodu 1, vyznačující se tím, že příslušný antigen se polymerizuje glutaraldehydem.

3. Způsob přípravy imunoreagencií podle bodů 1 a 2 vyznačující se tím, že se dialýza provádí do prostředí o iontové síle $I = 0,15$.

O P R A V A

k PVAO č. 240 749 Int. Cl⁴ G 01 N 33/53

Ve vytištěném popise vynálezu k autorskému osvědčení č. 240 749, (PV 9752-84) byly uvedeny chybně údaje.

Správně má být:

sloupec 4, řádek 17 a 60
iontové síle $I=0,005$ až $0,02$.

sloupec 4, řádek 24
iontové síle $I=0,015$.

v 1. bodě definice předmětu vynálezu
iontové síle $I=0,005$ až $0,02$.

ve 3. bodě definice předmětu vynálezu
iontové síle $I=0,015$.

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY