



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

209 966

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 21 01 80
(21) PV 383-80

(51) Int. Cl.³ A 61 K 39/395

(40) Zveřejněno 31 03 81
(45) Vydáno 31 08 82

(75)

Autor vynálezu SCHLEGELOVÁ JARMILA RNDr., BRNO
RYŠÁNEK DUŠAN MVDr., BRNO
ZRALÝ ZDENĚK MVDr., BRNO

KUMMER VLADIMÍR MVDr. CSc., BRNO
HRUŠKA KAREL Doc. MVDr. CSc., BRNO
ČANDERLE JIŘÍ MVDr., BRNO

- (54) Způsob přípravy specifických protilátek použitelných "in vitro" pro imunochemické reakce nebo "in vivo" k snížení koncentrace nebo aktivity některých látek v organismu

Vynález řeší přípravu protilátek pro imunochemické reakce "in vitro" nebo pro použití "in vivo" k snížení koncentrace nebo aktivity některých látek v organismu, s možností jednoduché kontroly tvorby protilátek.

Emulgovaný antigen v Al-Span-Oil adjuvans je aplikován kožám v narkóze intradermálně po 0,1 ml na 50 míst opakovaně v třítydenních intervalech, nejméně třikrát, do dosažení vysoké hladiny protilátek. Tvorba protilátek je sledována v průběhu imunizačního procesu turbidimetricky. Příkladem použití tohoto schématu je příprava protilátek proti králičímu gamaglobulinu a sérovému gonadotropinu ze séra březích klisen a jejich precipitační nebo biologická kontrola.

Vynález se týká způsobu přípravy specifických protilátek použitelných "in vitro" pro imunochemické reakce nebo "in vivo" k snížení koncentrace některých látek v organismu nebo k snížení jejich aktivity. Postup se osvědčil například při přípravě precipitační protilátky proti králičím globulinům, používané při radioimunoanalýze k precipitaci specifické protilátky s navázanou radioaktivní látkou nebo při přípravě protilátky proti sérovému gonadotropinu ze séra březích klisen. Protílátka proti sérovému gonadotropinu může být použita ke snížení aktivity tohoto hormonu po jeho aplikaci jalovicím, kravám, prasnicím a dalším zvířatům pro stimulaci ovariální aktivity, dále může být použita k radioimunoanalytickému nebo imunochemickému stanovení gonadotropinu.

Podle běžných způsobů se protilátky nejčastěji připravují aplikací antigenu s Freundovým adjuvans podkožně na 2 až 4 místa králíkům, ovčím, kozám nebo prasatům. Zejména u králíků se někdy používá aplikace antigenu do kůže na mnoho míst i do tlapek. Naše zkušenosti prokazují, že vysoce účinným způsobem získání kvalitních protilátek je imunizace koz v narkóze na mnoho míst intradermálně (do kůže) antigenem s Al-Span-Oil adjuvans. Adjuvans je přípravek emulzního typu dodávaný ve dvou oddělených složkách. Složka I je suspenze hydroxidu hlinitého ve vodě, složka II obsahuje parafinový olej a detergens s vhodnou hodnotou hydrorilně-lipofilní rovnováhy. Práce v narkóze má význam nejen pro usnadnění manipulace se zvířetem, ale přispívá i k lepší tvorbě protilátek. Al-Span-Oil adjuvans nahrazuje s výborným výsledkem dovážené nebo individuálně připravované Freundovo adjuvans. Použití koz k imunizaci je výhodné pro snadnější manipulaci ve srovnání s ovci nebo prasaty, pro větší objem získání protilátky ve srovnání s králíky nebo krůtami a pro snadnější provedení aplikace i sledování reakcí organismu.

Způsob přípravy protilátek spočívá v použití emulze antigenu v Al-Span-Oil adjuvans k opakované intradermální aplikaci kozám v narkóze na více míst, odběru krve za 10-20 dnů po poslední imunizaci a současně prováděném turbidimetrickém sledování tvorby protilátek v krvi imunizovaného zvířete.

P ř í p r a v a a n t i g e n u. Příkladem přípravy antigenu k imunizaci je emulgace králičího gamaglobulinu a sérového gonadotropinu. Dva mililitry roztoku králičího gamaglobulinu o koncentraci 1,6 mg globulinu/1 ml fosfátového pufru je smícháno se 2 ml suspenze hydroxidu hlinitého ve vodě (složka I Al-Span-Oil adjuvans). Po 60 minutách inkubace za chladu je suspenze s antigenem převedena ve 4 dávkách do 6 ml olejové složky II adjuvans s důkladným protřepáním po každém přidání k dosažení dobré emulgace.

Rozpuštěním 5 000 m.j. lyofilizovaného sérového gonadotropinu ve 2 ml vody pro injekce je připraven antigen ke smíchání a emulgaci se složkami Al-Span-Oil adjuvans jak je popsáno výše.

Z p ů s o b i m u n i z a c e. Imunizace koz se provádí v celkové inhalační narkóze, celkem třikrát, v intervalech tří týdnů. Při každé imunizaci se aplikuje intradermálně po 0,1 ml emulze, obsahující například 0,32 mg globulinu v 1 ml nebo 500 m.j. gonadotropinu v 1 ml, do distálních partií předních končetin (15 vpichů), do distálních partií zadních končetin (15 vpichů) a v krajině lumbální (20 vpichů). Celkem je při každé imunizaci aplikováno 5 ml emulze. V imunizaci je možno pokračovat i po době delší než tři týdny.

Obvykle pak postačují dvě aplikace v třítydenním intervalu k dosažení kvalitní protilátky, která se získává vždy za 10 až 20 dnů po poslední imunizaci.

Ověření tvorby protilátky. V průběhu imunizace se v týdenních intervalech odebírá krev na sérum a v séru se turbidimetricky sleduje tvorba protilátky. K 1 ml séra desetkrát zředěného fyziologickým roztokem se přidá do zkumavek 5, 10, 30, 50, 100 a 200 μ l antigenu (například 0,8 mg globulinu/1 ml nebo 500 m.j. gonadotropinu/1 ml). Po zamíchání a 15 minutách stání při laboratorní teplotě se měří vzniklý zákal při 506 nm. V průběhu imunizace dochází v souvislosti s tvorbou protilátek k postupně se zvyšujícímu množství precipitátu. Účinná protilátka musí vykázat nejvyšší precipitát s 200 μ l antigenu, v druhém případě alespoň se 100 μ l antigenu. Dva týdny po poslední imunizaci se odebere krev do roztoku sodné soli kyseliny etylendiaminotetraoctové $c=0,545$ mol/l (0,1 ml na 10 ml krve). Po odstředění se na 100 ml plazmy přidá 1 ml roztoku CaCl_2 $c=1$ mol/l. Sérum z plazmy se pak získá po 5 hodinách stání při laboratorní teplotě odstředěním vyvráženého fibrinu ($20\,000\text{ m.s}^{-2}$, 30 min, 4°C).

Biologická kontrola účinnosti protilátky proti sérovému gonadotropinu (PMSG). Pro kontrolu účinnosti protilátky proti PMSG byly použity infantilní myši samičky, u kterých byl pomocí PMSG stimulován růst folikulů vyvolávající zvětšení dělohy. Skupině myši bylo aplikováno současně s PMSG kozí anti-PMSG sérum. Z výsledku je zřejmé, že 1 μ l protilátky proti PMSG neutralizoval biologický účinek 1 m.j. PMSG.

Předpokládaný neutralizační účinek byl ověřen u 4 jalovic, které byly ošetřeny současně PMSG a anti-PMSG sérem. V následující říji kontrolované klinicky a stanovením hormonálních hladin v periferní krvi, byl u všech zvířat zjištěn normální průběh říjových příznaků s jednou ovulací, což prokázalo úplné vyblokování sérového gonadotropinu. Po inseminaci 2 jalovice zabřezly.

Aplikací anti-PMSG séra 9 jalovicím, stimulovaným pomocí PMSG za účelem vyvolání superovulace, bylo dosaženo čtyřnásobně většího zisku kvalitních, životaschopných raných embryí ve srovnání se skupinou 9 jalovic bez ošetření. Z provedených experimentálních prací vyplývá, že ověřované kozí anti-PMSG sérum má i po parenterální aplikaci jalovicím specifický neutralizační účinek, zjevně nenarušuje řídící mechanismus pohlavních funkcí a při superovulaci poskytuje významný pozitivní efekt.

PŘEDMĚT VÝNÁLEZU

1. Způsob přípravy specifických protilátek použitelných "in vitro" pro imunochemické reakce nebo "in vivo" k snížení koncentrace nebo aktivity některých látek v organismu vyznačený tím, že preparát obsahující antigen, například králičí imunoglobulin nebo gonadotropin ze séra březích klisen, se emulguje dvousložkovým adjuvans, které obsahuje suspenzi hydroxidu hlinitého ve vodě a parafinový olej s detergens, vzniklá emulze se aplikuje kozám v narkóze intradermálně a opakovaně v třítydenních intervalech, vždy na více, například 50 míst, 10 až 20 dnů po poslední imunizaci se odebere krev imunizovaného zví-

řete do antikoagulačního prostředku, například solné soli kyseliny etylendiaminotetraoctové, odstředěním se zbaví buněčných elementů a z odstředěné plazmy se antisérum izoluje a upraví do skladovatelné formy.

2. Způsob podle bodu 1 vyznačený tím, že tvorba protilátky v průběhu procesu imunizace se sleduje v krevním séru imunizovaného zvířete turbidimetricky.