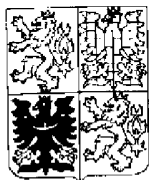


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLového
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **08.12.1995**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **08.12.1995**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1995/IE9500061**
(33) Země priority: **WO**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.08.2001**
(Věstník č. 8/2001)
(86) PCT číslo: **PCT/IE95/00061**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO97/22003**

(21) Číslo dokumentu:

1998 - 1553

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

G 01 N 33/53
G 01 N 33/68
G 01 N 33/573

(71) Přihlašovatel:
BIOTRIN INTELLECTUAL PROPERTIES LIMITED,
Mount Merrion, IE;

(72) Původce:
Doyle John Martin, Deansgrange, IE;
Kilty Cormac Gerard, Sandycove, IE;

(74) Zástupce:
Reichel Pavel Ing., Lopatecká 14, Praha 4, 14700;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob určování nebo zjišťování poškození
dárcovského orgánu po xenotransplantaci
pomocí analýzy látek pocházejících z orgánu
dárce**

(57) Anotace:

Způsob určování nebo zjišťování přítomnosti analytu dárcovského orgánu ve v podstatě nedárcovské biologické tekutině, za přítomnosti nebo nepřítomnosti odpovídajícího analytu příjemce, který ukazuje na poškození dárcovského orgánu po xenotransplantaci a umožňuje identifikovat poškození xenotransplantátu u příjemce, zahrnuje zachycení nebo detekování uvedeného analytu dárce pomocí protilátky, která je buďto a) specifická pro analyt dárcovského orgánu a nevykazuje zkříženou reakci s odpovídajícím homologickým analytem příjemce; nebo b) schopná zkřížené reakce s uvedeným analytem dárcovského orgánu, kde její reaktivita s analytem dárcovského orgánu a s homologickým analytem příjemce jsou kvantitativně odlišitelné, a na přímém nebo nepřímém stanovení analyzovaného parametru dárcovského orgánu.

Způsob určování nebo zjišťování poškození dárcovského orgánu po xenotransplantaci pomocí analýzy látek pocházejících z orgánu dárce

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu zjišťování poškození dárcovského orgánu po xenotransplantaci, a to určením nebo detekcí přítomnosti analyzovaného parametru dárcovského orgánu v biologické tekutině.

Dosavadní stav techniky

V současné době se svět potýká s nedostatkem dárcovských orgánů pro alotransplantaci (např. jater, ledvin a srdcí). Objevily se návrhy, a bylo i prokázáno, že tento problém lze, byť dočasně, překonat použitím orgánů zvířat před vlastní ortotopickou transplantací. Chari, R.S., et al. (The New England Journal of Medicine 1994; 33, č. 4, s. 234-237) řešili selhání funkce jater ex vivo perfúzí prasečích jater s následnou ortotopickou transplantací jater. Jeden pacient tak zůstal ve stabilizovaném stavu po dobu 10 dní a poté u něj byla úspěšně provedena ortotopická transplantace jater. Dřívější pokusy o transplantaci orgánů mezi různými živočišnými druhy (xenotransplantace) však dosud nebyly úspěšné kvůli jevu, označovanému jako hyperakutní rejekce, kdy dojde během několika hodin od implantace příjemci k odhojení (rejekci) nově transplantovaného orgánu, který není imunitním systémem hostitele přijat. Pokrok, dosažený v poslední době v oblasti molekulární genetiky, umožnil vývoj transgenních zvířat (hlavně vepřů), jejichž orgány jsou geneticky upraveny tak, aby byly po přenosu do orgánů jiných živočišných druhů méně imunogenní (např. člověk versus primát jiný než člověk) (Transplant News 1995; 5, č. 9). V této zprávě se předpokládá možnost, že imunotolerance se zajistí expresí genu pro lidský "faktor akcelerace rozkladu" v transgenním orgánu, který zabrání aktivaci komponent komplementu hostitele (např. komplexu Cb3) a omezí tak hyperakutní rejekci na minimum. Stejně jako v případě

transplantace orgánů stejných živočišných druhů (alotransplantace) však rejekce xenograftu stále ještě představuje problém, s nímž se musí transplantolog potýkat, a který je dále komplikován zjevnou skutečností, že u příjemce štěpu jsou přítomny tkáně různých živočišných druhů.

Klasické testy jaterní funkce nedokáží rozlišit mezi analyzovanými parametry dárcovského a příjemcovského (např. prasečího a lidského) orgánu. Například měření sérových hladin alaninaminotransferázy (ALT) a aspartátaminotransferázy (AST) nerozliší mezi prasečími a lidskými enzymy, takže jakákoli snaha o identifikaci posttransplantačního ^{vývoje} ~~zdroje~~ je naprosto bezpředmětná. Podobná situace existuje v případě analýzy parametrů renálního xenotransplantátu. Je třeba konstatovat, že v současnosti prostě neexistuje žádný obecně uznávaný proteinový marker zachovalosti (nepoškození) ledvin.

Glutathion S-transferázy (GSTs) představují multigenní rodinu proteinů, sestávající hlavně z isoformů třídy alfa (α GST), ~~mu~~ ^{mu} (μ GST), π (π GST) a theta (θ GST), definovaných isoelektrickým bodem, které mají na starosti detoxifikaci řady xenobiotik hlavně prostřednictvím konjugace glutathionu (Beckett, G.J a Hayes, J.D., *Advances in Clinical Chemistry* 1993; 30, s. 281-380). Vzhledem k jednotné distribuci α GST a k jeho relativně vysoké hladině v játrech člověka, a vzhledem ke krátkému plazmatickému poločasu (přibližně 1 hodina), je tento enzym jako ukazatel stavu jater po transplantaci a míry poškození jater léky citlivější, než jsou aminotransferázy.

V EP-A 0 640 145 je popsána pomocná metoda k časně diagnóze rejekce u příjemců jaterního štěpu, zahrnující měření zvýšení plazmatických nebo sérových hladin α GST při nepřítomnosti jakékoli změny v plazmatických nebo sérových hladinách transamináz, nebo dříve, než k nějaké změně dojde.

π glutathion S-transferáza je umístěna v cytoplazmě epitelových buněk žlučovodu v játrech; předpokládá se, že existuje

pouze ve formě homodimeru. Heterogenní intrahepatální distribuce GST naznačuje, že různé isoenzymy mají *in vivo* jedinečné funkce v různých oblastech jater, a lze tedy dospět k závěru, že měření plazmatických nebo jaterních hladin GST usnadní monitorování stavu jater jedince. Podobně jedinečná distribuce existuje i u tkání ledvin, kde se α GST vyskytuje v oblasti proximálního tubulu, a π GST se omezuje na oblast distálního tubulu nefronu (Campbell, J.A.H., et al., Cancer (Philadelphia) 1991; 67, s. 1608-1613). V nedávno publikované zprávě se objevila myšlenka, že simultánních detekcí α/π GST v lidské moči by bylo možno využít k rozlišení mezi nefrotoxitou cyklosporinu A a rejekcí štěpu (v tomto pořadí), a to díky místně specifické povaze inzultů příslušných tkání (Sunberg, A.G.M. et al., Nephron 1994; 67, s. 308-316).

Při detekci poškození orgánového štěpu, nebo k rozpoznání poškození hostitelského a/nebo dárcovského orgánu, je tudíž zapotřebí vyvinout metodu pro odlišení analyzovaných parametrů hostitele a štěpu.

Podstata vynálezu

Vynález se týká způsobu určování nebo zjišťování přítomnosti analyzovaného parametru dárcovského orgánu ve v podstatě nedárcovské biologické tekutině za přítomnosti nebo nepřítomnosti ~~odpovídajícího~~ ^{homologického} analyzovaného parametru příjemce, který ukazuje na poškození dárcovského orgánu po xenotransplantaci, a který ~~usnadňuje~~ ^{umožňuje} identifikaci ^{ovat} poškození xenotransplantátu u příjemce, kde tento způsob je založený na zachycení nebo detekci uvedeného analyzovaného parametru dárce pomocí protilátky, která je:

- a) specifická pro analyzovaný parametr dárcovského orgánu a nevykazuje zkříženou reakci s odpovídajícím homologickým analyzovaným parametrem příjemce; nebo
- b) schopná zkřížené reakce s uvedeným analyzovaným parametrem dárcovského orgánu, kde reaktivity s analyzovaným parametrem

dárcovského orgánu a homologickým analyzovaným parametrem příjemce mohou být kvantitativně odlišeny, a na přímém nebo nepřímém stanovení analyzovaného parametru dárcovského orgánu.

Způsob podle vynálezu umožňuje odlišit analyzované parametry hostitele od parametrů dárce, a tím získat informace o stavu xenotransplantátu a případné rejekci, aby bylo dle potřeby možno zahájit odpovídající terapii co nejdříve po zjištění analyzovaného parametru dárcovského orgánu v biologické tekutině příjemce, jak je podrobněji popsáno dále.

Biologickou tekutinou jsou zde míněny tělesné tekutiny jako je např. žluč, plazma, sérum a moč, jakož i tkáňová podpůrná média a perfuzáty. Tyto biologické tekutiny jsou také obecně označovány jako matrix.

Termínem dárcovský orgán se míní orgán jako takový, a také tkáň a buňky, které představují jeho nedílnou součást nebo z něj pocházejí.

Podobně se termínu dárcovský materiál používá k označení samotného orgánu i tkáni a buněk, které představují nedílnou součást tohoto orgánu nebo z něj pocházejí.

Tak například mohou být dárcovským materiálem játra, jaterní lalok jako jejich část, nebo hepatocyty. Obvykle se v případě hepatocytů používá termínu zásobník hepatocytů (hepatocyte cartridge).

Příjemcem v obecném slova smyslu může být člověk nebo primát jiný než člověk.

Vhodný dárcovský materiál tedy může pocházet z jiného primáta, než z člověka, nebo ze zvířete, jako je např. vepř, který je fyziologicky a biochemicky podobný člověku.

Dárcovským zvířetem může být transgenní zvíře.

Xenotransplantaci lze provést *in vivo* nebo *ex vivo*.

Orgánem vhodným pro xenotransplantaci je srdce, ledviny nebo játra.

Dárcovským analyzovaným parametrem je s výhodou protein, zejména enzym.

Ve výhodném provedení bude dárcovský analyzovaný parametr dárce-specifický. Je-li přítomen odpovídající analyzovaný parametr příjemce, je výhodou, má-li tento analyzovaný parametr příjemce nižší stupeň homologie s uvedeným analyzovaným parametrem dárcovského orgánu. Analyzovaný parametr dárcovského orgánu může mít i vyšší stupeň homologie (např. větší než 80% homologii) s odpovídajícím analyzovaným parametrem příjemce, a přesto jej lze stále ještě detekovat způsobem podle dále popsaného vynálezu.

Výhodným enzymem je glutathion S-transferáza, zejména α GST.

Výhodně se zachycený analyzovaný parametr dárcovského orgánu určuje pomocí imunoanalýzy. Mezi vhodné typy imunoanalýzy patří enzyomoimunoeseje.

Tak lze v případě prasečí α GST v lidské biologické tekutině zachytit prasečí α GST pomocí IgG [protilátky proti prasečí α GST], která se váže přímo nebo nepřímo na pevnou část, případně pomocí IgG[protilátky proti lidské α GST], která vykazuje zkříženou reaktivitu.

Získali jsme králičí polyklonální IgG [protilátku proti prasečí α GST], která je vysoce specifická vůči prasečí α GST. V případě, že tato protilátka také vykáže nižší stupeň (5-10 %) zkřížené reaktivity s lidskou α GST, zejména při vysokých koncentracích lidské α GST, pak lze lidskou α GST stanovit samostatně, a může být správně vypočteno množství prasečí α GST, což je popsáno dále.

Identifikovali jsme monoklonální protilátku proti lidské α GST s téměř 100% zkříženou reaktivitou vůči prasečí α GST, což je popsáno dále v příkladu 3.

Enzyomoimunoesej může být sendvičového nebo semikompetitivního typu, jak popsáno dále v příkladech 1 a 2.

Jedním z aspektů vynálezu je testování dárcovského materiálu na viabilitu před xenotransplantací.

Způsob podle vynálezu rovněž umožňuje testovat viabilitu dárcovského materiálu měřením analyzovaného parametru dárcovského orgánu v biologické tekutině, která protéká dárcovským materiálem.

Lze tak detekovat, kromě způsobu podle tohoto vynálezu, analyzovaný parametr pomocí kterékoli známé metody. Pokud je například analyzovaným parametrem orgánu enzym, pak lze uvedený orgánový parametr analyzovat a detekovat enzymovou esejí s použitím substrátu pro tento enzym.

Přehled obrázků

Na obr. 1 je schéma sendvičové enzyimoimuneseseje z příkladu 1.

Na obr. 2 jsou vyneseny hodnoty absorbance při 450/630 nm *versus* koncentrace α GST ($\mu\text{g/l}$) při použití imunometrické enzyimoimunoeseje sendvičového typu pro prasečí α GST z příkladu 1.

Na obr. 3 je schéma kompetitivní enzyimoimunoeseje z příkladu 2.

Na obr. 4 jsou vyneseny hodnoty absorbance při 540/630 nm *versus* koncentrace α GST ($\mu\text{g/l}$) při použití imunometrické enzyimoimunoeseje kompetitivního typu pro prasečí α GST z příkladu 2.

Na obr. 5 je analýza SDS-PAGE lidské a prasečí α GST.

Na obr. 6 je analýza "imunoblot" lidské a prasečí α GST pomocí IgG[protilátky proti lidské α GST] a konjugátu kozi IgG[protilátky proti králíčimu IgG]-HRP.

Na obr. 7 je analýza "imunoblot" lidské a prasečí α GST pomocí IgG[protilátky proti prasečí α GST] a konjugátu kozi IgG[protilátky proti králíčimu IgG]-HRP.

Na obr. 8 je analýza "imunoblot" lidské a prasečí α GST pomocí IgG[protilátky proti lidské α GST] a konjugátu kozí IgG[protilátky proti myším IgG]-HRP.

Příklady provedení vynálezu

Vynález bude blíže vysvětlen v následujících příkladech.

Příprava A

Čištění prasečí α GST

α GST byla získána z prasečích jater pomocí afinitní chromatografie a chromatofokusace (pH 9,5-6,0). Přesné podrobnosti postupu při čištění jsou následující:

a. 30 g prasečích jater bylo homogenizováno po dobu 2 minut v homogenizačním pufru v poměru jeden díl ke třem dílům pufru za použití Waringova mísidla (Waring je ochranná známka). Homogenizační pufr měl následující složení:

10 mM Tris-HCl	
250 mM glukózy	
5mM EDTA	pH 7,8
2 μ g/l leupeptinu	
2 μ g/l pepstatinu	

b. Jaterní homogenát byl centrifugován při 10000 g po dobu 60 minut.

c. Supernatant byl poté separován na koloně s afinitou pro glutathion (GSH)-Sepharosu, která byla předem ekvilibrována 10 mM Tris pH 9,1. Ekvilibrační pufr se znovu použil k eluci nenávaného proteinu. Nakonec se k eluci nevázané GST z afinitní kolony použilo 50 mM Tris pH 9,1 s obsahem 5 mM GSH.

d. Eluovaný materiál byl poté dialyzován proti 25 mM ethanolaminu pH 9,5 a aplikován na chromofokusační kolonu (PBE94, dodala firma Pharmacia). Elučním pufrem byl Polybuffer 96 (Polybuffer 96 je ochranná známka), připravený podle pokynů výrobce.

Příprava B

Výroba a čištění protilátek

Vyčištěná prasečí α GST se subkutánně (s.c.) injikovala novozélandským bílým králíkům podle dále uvedeného časového harmonogramu a sérum bylo hodnoceno na reaktivitu proti α GST. Titr IgG[protilátky proti prasečí α GST] byl určován semikvantitativní "dot blot" analýzou, a jakmile byl dostatečný, byli králíci usmrceni vykrvácením a z krve získáno sérum. Protein A afinitní chromatografií bylo z králíčího séra odděleno celkové množství IgG, který byl použit jak k potažení mikrotitrační destičky (semikompetitivní EIA - příklad 2), tak i k biotinylování (sendvičová EIA - příklad 1). Monoklonální IgG[protilátky proti lidské α GST] byly získány z fakultní nemocnice v Nijmegen (Nizozemí) jako ascites, a před použitím nebyly vyčištěny.

Harmonogram imunizace (obecně):

1. den: Byl proveden zkušební odběr 5 ml preséra z ucha králíka a poté se 0,5 ml prasečího antigenu α GST (100 μ g) smíchalo se stejným objemem Freundova úplného adjuvans. Antigen a adjuvans byly homogenizovány tak, aby vznikla dokonalá emulze. Tato směs byla poté injikována s.c. na několika místech do zad králíka, kterému byla předtím vyholena srst.

28. den: Byl proveden zkušební odběr 5 ml séra z ucha králíka a poté se 0,5 ml antigenu (100 μ g) smíchalo se stejným objemem Freundova úplného adjuvans. Antigen a adjuvans byly homogenizovány tak, aby vznikla dokonalá emulze. Tato směs byla poté injikována s.c. na několika místech do zad králíka.

42. den: Byl proveden zkušební odběr 10 ml krve z ucha králíka.

56. den: Králíkovi byla podána druhá "boost", jak uvedeno pro 28. den.

70. den: Byl proveden zkušební odběr 10 ml krve z ucha králíka. Když byl titr dostatečně vysoký, byl králík utracen a bylo odebráno co nejvíce krve.

Příprava C

Imunoblotting

Všechny polyklonální a monoklonální IgG použité v následujících příkladech byly zkontrolovány na reaktivitu a zkříženou reaktivitu proti lidské a prasečí α GST (v tomto pořadí) pomocí následujících kombinací imunoblotů:

(a) králíčí IgG[protilátka proti lidské α GST] byla použita k testování nitrocelulózových membrán, obsahujících imobilizovanou lidskou a prasečí α GST.

(b) králíčí IgG[protilátka proti prasečí α GST] byla použita k testování nitrocelulózových membrán obsahujících imobilizovanou lidskou a prasečí α GST.

(c) myší IgG[protilátka proti lidské α GST] byla použita k testování nitrocelulózových membrán obsahujících imobilizovanou lidskou a prasečí α GST.

Detekce "imunoblot" byla provedena následujícím způsobem:

1. U lidské i prasečí α GST (0,5 μ g/dráha) byla provedena elektroforéza na 15 % SDS-PAGE a byly včleněny markery molekulární hmotnosti.

2. Po elektroforéze se polyakrylamidový gel odřizl a jedna polovina byla obarvena, zatímco zbytek byl použit k elektroforetickému transferu na nitrocelulózu.

3. Po elektroforetickém transferu byly nitrocelulózové membrány blokovány po dobu 1 hodiny 5% (w/v) činidlem Marvel (Marvel je ochranná známka) v blokačním pufru PBST (fosfátem pufovaný fyziologický roztok obsahující 0,05 % (w/v) TWEEN-20[®]).

4. Poté byly připraveny následující roztoky:

- (i) králičí IgG[protilátka proti lidské α GST] v 1% (w/v) Marvel v PBST
- (ii) králičí IgG[protilátka proti prasečí α GST] v 1% (w/v) Marvel v PBST
- (iii) myší IgG[protilátka proti lidské α GST] v 1% (w/v) Marvel v PBST

a přidány do membrán ihned po odlití blokačního pufru. Inkubace s roztoky protilátek se nechala probíhat po dobu jedné hodiny.

5. Nitrocelulózové membrány byly poté promyty v PBST (2x vždy po dobu 5 minut).

6. Poté by připraven konjugát anti-králičí IgG-HRP (1/1000 v 1% (w/v) Marvel v PBST) a přidán do roztoků uvedených výše pod bodem 4 (i) a (ii). Rovněž byl připraven konjugát anti-myší IgG-HRP (1/1000) a přidán do roztoku uvedeného výše pod bodem 4 (iii). Konjugáty protilátek různých živočišných druhů (králík/myš), použité

k imunodetekci, byly získány od společnosti Bio-Rad Laboratories Limited.

7. Po jednohodinové inkubaci s konjugáty protilátek různých živočišných druhů byla reagentia zlikvidována a membrány byly promyty, jak uvedeno výše v bodě 5.

8. Poté byl připraven substrát diaminobenzidinu a přidán do membrán. Hnědý precipitát na nitrocelulózové membráně znamenal pozitivní reakci.

Příprava D

Syntéza konjugátu prasečí α GST-křenová peroxidáza (horseradish peroxidase, HRP)

Konjugáty α GST-HRP byly syntetizovány za použití metodologie konjugace thioetheru. Pomocí SMCC (sukcinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyklohexan 1-karboxylát) byly do molekul α GST zavedeny reaktivní maleimidové skupiny a na HRP byly navázány maskované sulphydrylové skupiny (Dunanc, R.J.S., et al., Anal. Biochem. 1983; 132, 68-73). Po odmaskování za účelem vytvoření reaktivních sulphydrylových skupin se maleimidem aktivované α GST a HRP-SH smíchaly dohromady a nechaly se reagovat po dobu 4,5 hodiny. Výsledný konjugát α GST-HRP, vzniklý kovalentní thioetherovou vazbou, byl přenesen do 50% ~~(v/v)~~ glycerolu a uchováván při teplotě -20°C pro použití při semikompetitivní EIA v příkladu 2.

Příprava E

Biotinylace IgG[protilátka proti prasečí α GST]

Biotinylovaná IgG[protilátka proti prasečí α GST] byla připravena navázáním vyčištěné polyklonální IgG[protilátka proti prasečí α GST], která byla získána imunizací králíků vyčištěnou α GST (příprava B), na N-hydroxysukcinimid-Biotin (NHS-Biotin) v zásaditém

prostředí. Reakci nespotřebovaný NHS-Biotin by poté odstraněn extenzivní dialýzou, biotinylovaný IgG byl rozdělen na alikvoty a uchováván ve zmrazeném stavu při teplotě -20°C až do použití.

Příklad 1

Sendvičová enzymoimunoesej

Postup je schematicky znázorněn na obr. 1.

a. Mikrotitrační deska Nunc Maxisorp (Nunc Maxisorp je ochranná známka) byla potažena myší monoklonální IgG[protilátkou proti lidské αGST] (viz příprava B) imobilizovanou pomocí kozích fragmentů F(ab)_2 [protilátky proti myšimu IgG]. Takový způsob potažení protilátek slouží k orientaci vazebných míst Mab a zlepšuje i citlivost eseje tím, že omezuje na minimum adherenci indukovanou denaturací zachycovací protilátky. Mikrotitrační desky byly blokovány roztokem proteinu/glukózy.

b. Jako kalibrátor eseje byla použita prasečí αGST , která byla purifikována z jater (příprava A) okamžitě po expiraci a uchovávaná při teplotě $2-8^{\circ}\text{C}$ nebo -20°C .

c. K usnadnění detekce zachycené/imobilizované αGST byly použity biotinylované konjugáty IgG[protilátky proti prasečí αGST].

d. Poté byl k detekci celého sendvičového komplexu antigenu použit konjugát Streptavidinu a křenové peroxidázy (HRP) ve spojení s užitím substrátu tetramethylbenzidinu (TMB).

e. Enzymová reakce byla ukončena přidáním $1\text{ N H}_2\text{SO}_4$ a byla změřena absorbance při 450 nm , jako referenční vlnová délka byla použita vlnová délka 630 nm . Intenzita barev odpovídá koncentraci αGST a po vynesení $A_{450/630\text{ nm}}$ versus koncentrace ($\mu\text{g/l}$) lze stanovit

koncentraci neznámých vzorků (viz obr. 2). Celková doba trvání eseje byla kratší než 3,5 hodiny.

Příklad 2

Semikompetitivní enzymoimunoesej

Postup je schematicky znázorněn na obr. 3.

a. V tomto případě byly desky Nunc Maxisorp potaženy polyklonální IgG[protilátkou proti prasečí α GST] imobilizovanou pomocí proteinu A, protože bylo zjištěno, že potažení přímo polyklonálním IgG neusnadnilo zachycení α GST, nejspíše v důsledku denaturace IgG při navázání na mikrotitrační desku.

b. α GST, značená HRP, byla v tomto případě použita jako konjugát a byla přidána do mikrojamky k neznačenému kalibračnímu vzorku. Tak se spustila reakce kompetičního typu mezi HRP značenou α GST a neznačenou α GST.

c. Po uplynutí dostatečné inkubační doby, za normálních okolností 60 minut, byla mikrotitrační deska promyta a přidal se substrát TMB.

d. Enzymová reakce byla zastavena přidáním 1 N H_2SO_4 a byla změřena absorbance při 450 nm s použitím 630 nm jako referenční vlnové délky. Intenzita barev je v inverzním vztahu ke koncentraci α GST a po vynesení $A_{450/630 \text{ nm}}$ versus koncentrace ($\mu\text{g/l}$) lze kvantifikovat neznámé vzorky (viz obr. 4).

Příklad 3

Hodnocení čistoty reagensů imunoeseje

Imunoblotting se prováděl postupem popsáním v přípravě C. Výsledky jsou uvedeny na obr. 5 až 8.

Klíč k drahám na obr. 5 až 8.

Dráha 1: markery molekulární hmotnosti.

Dráha 2: lidská α GST (0,5 μ g).

Dráha 3: prasečí α GST (0,5 μ g).

Obr. 5 ilustruje čistotu lidské a prasečí α GST před použitím k imunizaci králíků (v obou případech ji indikuje jednoduchý pás) a potvrzuje absenci jakýchkoli jiných lidských nebo prasečích proteinů, které by jinak mohly přispívat k nižší specifitě analýzy. Analýza typu "immunoblot" reaktivity protilátek ukazuje, že IgG[proti látka proti lidské α GST] je vysoce specifická vůči lidské α GST a nevykazuje významnou zkříženou reaktivitu vůči prasečí α GST (obr. 6), což bylo prokázáno silnou intenzitou signálu lidské α GST ve srovnání se slabou intenzitou signálu prasečí α GST. Tento nálezn je podepřen nepřítomností reaktivity prasečí α GST ([α GST]p), je-li zkoumána enzyomoimunoesejí se specifitou na lidskou α GST ([α GST]h). Tento test je pod názvem HEPKIT dodáván společností Biotrin International Limited, Mount Merrion, County Dublin, Irsko. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1, která představuje hodnocení reaktivity [α GST]p pomocí HEPKITu společnosti Biotrin. Je zřejmé, že při stanovení [α GST]p pomocí HEPKITu ke zkřížené reaktivitě nedochází.

Tabulka 1

[α GST]h (μ g/l)	A _{450/630 nm}
0,00	0,069
1,25	0,156
2,50	0,332

5,00	0,627
10,0	1,088
20,0	1,495
40,0	1,762
PC	0,839 (6,9 µg/l)

[αGST]p (µg/l)	A _{450/630 nm}
8	0,012
40	0,010
200	0,012
1000	0,014

PC = pozitivní kontrola

Významnost této maximálně důležité skutečnosti spočívá v tom, že enzymoimunoesej ke stanovení lidské αGST je pro detekci lidské αGST specifická. Jakoukoliv přítomnost lidské αGST ve vzorcích, v nichž se bude měřit i prasečí αGST, lze tudíž detekovat specificky, bez zkřížené kontaminace prasečím antigenem. Nepřítomnost zkřížené reaktivity v enzymoimunoeseji lidské αGST a nález přibližně 5-10% zkřížené reaktivity mezi IgG[protilátkou proti prasečí αGST] a lidskou αGST (obr. 7), což indikuje slabá intenzita signálu lidské αGST ve srovnání se silnou intenzitou signálu prasečí αGST, znamená, že výsledky imunoeseje na prasečí αGST mohou být korigovány s ohledem na možný příspěvek lidské αGST, provede-li se současně s enzymoimunoesejí pro zjištění prasečí αGST také kvantifikace lidské αGST enzymoimunoesejí HEPKIT.

Pokud se například ve vzorku zjistí hodnoty:

esej	α GST ($\mu\text{g/l}$)
prasečí EIA (prasečí α GST)	10000
HEPKIT EIA (lidská α GST)	1000

znamená to, je-li předpokládána přibližně 7% zkřížená reaktivita lidské α GST v prasečí EIA, že příspěvek lidské α GST k hodnotám prasečí α GST činí

$$1000/100 \times 7 = 70 \mu\text{g/l}.$$

Je tedy přítomno $10000 - 70 = 9930 \mu\text{g/l}$ prasečí α GST.

Dále k výše uvedenému je na obr. 8 ilustrována rozsáhlá zkřížená reaktivita mezi myší IgG[protilátkou proti lidské α GST] a prasečí α GST, kterou indikuje srovnatelná intenzita příslušných pásů/signálů. Pro tento jev bylo této protilátky výhodně použito v sendvičové imunoeseji pro prasečí α GST v příkladu 1 jako "zachycovací" protilátky, nebo jako protilátky k potažení desek.

Příklad 4

Specifická eseje

Protože se eseje v příkladech 1 a 2 budou používat přednostně k detekování prasečí α GST v neprasečích biologických tekutinách, je třeba zhodnotit citlivost a specifitu těchto esejí pomocí prasečí α GST přítomné v následujících matrix:

- lidská moč
- lidské sérum
- lidská plazma
- lidská žluč
- tkáňově podpůrná média

K provedení této analýzy byla prasečí α GST "nasazena" do všech výše uvedených matrix a následně analyzována použitím imunoesejí uvedených v příkladech 1 a 2. Kromě kvantitativní detekce α GST byla hodnocena i linearita eseje (paralelismus), a tím provedena zkouška citlivosti. Protože je nutné, aby eseje svou specificitou zajistila detekci pouze prasečí α GST, a aby jakákoli výskyt lidské α GST nezpůsobil významnou interferenci, byla ve vzorcích prasečí α GST, porušených různým množstvím lidské α GST, zjišťována a měřena potenciální zkřížená reaktivita lidské α GST. Pokud existuje významná sekvenční homologie mezi oběma isoenzymy, nejedná se o pouhý triviální problém, a případ musí být řešen extenzivním testováním antiséra [protilátky proti prasečí α GST] na potenciální zkříženou reaktivitu s lidskou α GST.

Výsledky měření prasečí α GST v různých vzorových matrix, zjištěné pomocí enzymoimunoesejí sendvičového a semikompetitivního typu, jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2

Hodnoty prasečí α GST v upravených vzorcích, zjištěné
sendvičovou a semikompetitivní imunoesejí

Oček. hodn. (μ g/l)	Ředidlo vzorku (μ g/l)		Plazma- lidská (μ g/l)		MEM (kompl.) (μ g/l)		TC-100 (kompl.) (μ g/l)		Moč-lidská (μ g/l)	
	S	K	S	K	S	K	S	K	S	K
0	61,4	19,4	0	-	0	46,8	0	73	0	84
4000	4530	3853	4299	Neměř.	4135	3643	4754	3889	4189,5	3936
2000	2980	2699	2500	Neměř.	2262	2420	2059	2071	2165,2	1912
1000	-	-	1041	Neměř.	1180	1247	983	953	844,5	857
500	507	446	249	Neměř.	512	485	540	562	392,8	454
250	279	260	85	Neměř.	290	211	273	266	151,9	218
125	128	140	0	Neměř.	136	188	197	163	17,9	126

Klíč:

1.S: Sendvičová enzyoimunoesej

2.K: Semikompetitivní enzyoimunoesej

3.Vzorky naředěny v poměru 1/5 pro kompetitivní esej (v rozmezí 0-1000 μ g/l), poté dále naředěny do poměru 1/100 pro sendvičovou esej (v rozmezí 0-40 μ g/l)

4.MEM a TC-100: tkáňově podpůrná média

Pozn. překl.: neměř. = neměřitelné

Z tabulky 2 je zřejmé, že prasečí α GST lze zachytit a kvantifikovat ve všech testovaných matrix. Bylo prokázáno, ~~podstatné,~~ ~~a to,~~ že prasečí α GST je možno detekovat jak v lidské plazmě, tak i v lidské moči, a je tedy možno usnadnit posouzení stavu jaterního a ledvinného xenotransplantátu (v tomto pořadí). Za zmínku stojí, že se matrix plazmy ukázal jako neslučitelný se semikompetitivní imunoesejí, snad v důsledku interakce IgG s imobilizovaným

proteinem A, což vedlo k hodnotovým anomáliím. Jinak se zdá, že všechny další tekutiny jsou slučitelné s oběma typy esejí. Zvláště významná je možnost detekce prasečí α GST v tkáňově podpůrných médiích, což by mělo zajistit možnost hodnocení xenotransplantátu ještě před vlastním výkonem, nebo umožnit analýzu viability izolovaných prasečích hepatocytů (přítomných v zásobnících), neboť tyto systémy jsou obvykle uchovávány v klasických podpůrných médiích. Dále může zjištěná kompatibilita vzorových matrix značně usnadnit detekci α GST v médiích, která jsou používána k udržování dárcovských orgánů (např. jater) ex vivo, kdy je orgán extrakorporálně v kontaktu s kultivačním médiem.

Příklad 5

Hodnocení interference lidské α GST v sendvičové enzymoimunoeseji prasečí α GST

V sendvičové enzymoimunoeseji prasečí α GST z příkladu 1 byla vyhodnocována interference lidské α GST. Interference byla zjišťována jako zvýšené hodnoty absorbance. Byla-li koncentrace lidské α GST v mikrojамce nižší než 25 $\mu\text{g/l}$ (ekvivalent koncentrace vzorku 125 $\mu\text{g/l}$ při zředění ředidlem v poměru 1/5), nebyla v esejí pozorována žádná interference. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3

[α GST]p	[α GST]h ($\mu\text{g/l}$)	Absorbance 450/630 nm
20	-	0,869
20	6	0,875
20	12	0,875
20	25	0,881
20	50	0,975

Klíč:

α GST p - prasečí α GST

α GST h - lidská α GST

Výsledky uvedené v tabulce 3 demonstrují specifitu imunoesejí k detekci prasečí α GST. Z uvedených dat je zřejmé, že lidská α GST v prováděné enzyoimunoeseji neinterferuje ani při tak vysokých koncentracích vzorku jako je 125 μ g/l (25 μ g/l x 5), což představuje hodnotu 15krát a 6krát vyšší, než je horní hranice normálních hodnot pro lidskou α GST v séru a v moči (v tomto pořadí). Je patrné, že při vyšších hladinách lidské α GST (> 250 μ g/l, 50 μ g/l x 5) k jisté interferenci dochází. Bylo vypočítáno, že existuje 5-10% zkřížená reaktivita mezi lidskou α GST a IgG[protilátkou proti prasečí α GST]. Souběžné stanovení hladin α GST kvantitativní imunoesejí pro lidskou i pro prasečí α GST však umožní přesně vypočíst množství přítomné lidské α GST, a toto množství pak vzít v úvahu při kvantifikaci prasečí α GST v lidských biologických tekutinách.

Je třeba dále poznamenat, že imunoesejí podle vynálezu lze použít rovněž k detekci prasečí α GST v prasečích biologických tekutinách, jak by tomu bylo v případě provádění *in vitro* nebo *in vivo* toxikologických studií s vepři nebo prasečími orgány. Toto zjištění je významné, protože je známo, že prasečí a lidská fyziologie a biochemie jsou poměrně podobné, a proto se vepři často používají jako zvířecí modely k predikci lékové toxicity u člověka.

PATENTOVÉ NÁROKY

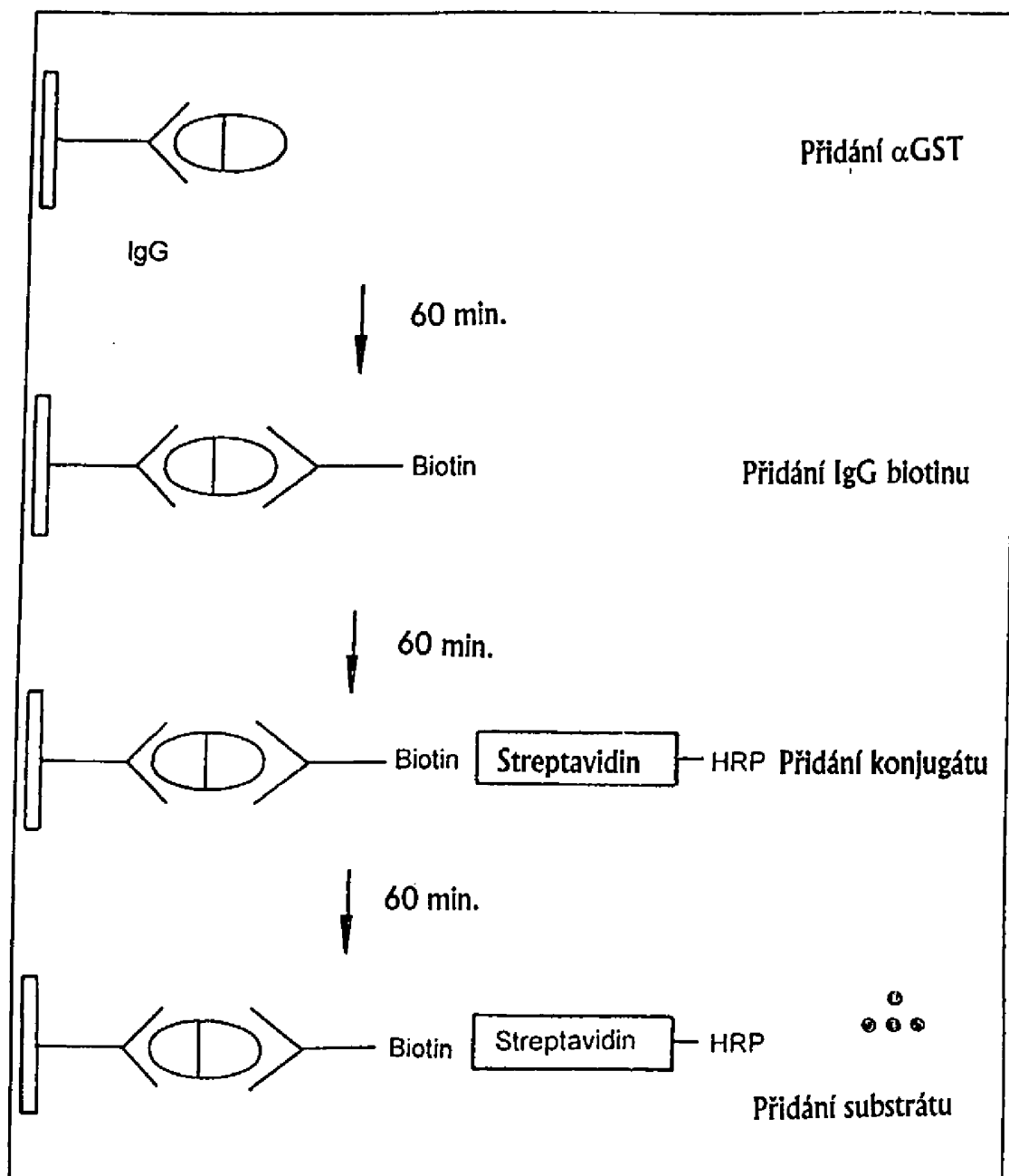
analytu pocházejícího z

1. Způsob určování nebo zjišťování přítomnosti ~~analyzovaného parametru~~ dárce orgánu ve v podstatě nedárce orgánu biologické tekutině, za přítomnosti nebo nepřítomnosti odpovídajícího ^{tu} ~~analyzovaného parametru~~ příjemce, který ukazuje na poškození dárce orgánu po xenotransplantaci, ^{a umožňuje} ~~usnadňující~~ ^{ovat} identifikaci poškození xenotransplantátu u příjemce, kde tento způsob zahrnuje zachycení nebo detekování uvedeného ^{tu} ~~analyzovaného parametru~~ dárce ^{ovského} orgánu pomocí protilátky, vyznačující se tím, že tato protilátka je buďto

- a) specifická pro ^t ~~analyzovaný parametr~~ dárce orgánu a nevykazuje zkříženou reakci s odpovídajícím homologickým ^{tem} ~~analyzovaným parametrem~~ příjemce; nebo ^{tem}
- b) schopná zkřížené reakce s uvedeným ~~analyzovaným parametrem~~ dárce orgánu, ^{mezi její} ~~kde~~ reaktivity s ^{tem} ~~analyzovaným parametrem~~ dárce orgánu a homologickým ~~analyzovaným parametrem~~ příjemce ^{jsou} ~~mohou být kvantitativně odlišeny~~ ^{itělné,}
- a na přímém nebo nepřímém stanovení ^{tu} ~~analyzovaného parametru~~ dárce orgánu.

2. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že příjemcem je člověk.
3. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že příjemcem je primát jiný než člověk.
4. Způsob podle některého z nároků 1 až 3, vyznačující se tím, že dárce orgán pochází z vepře.
5. Způsob podle některého z nároků 1 až 4, vyznačující se tím, že orgánem je ledvina.
6. Způsob podle některého z nároků 1 až 4, vyznačující se tím, že orgánem jsou játra.
7. Způsob podle některého z nároků 1 až 6, vyznačující se tím, že ^{tem} ~~analyzovaným parametrem~~ dárce orgánu je protein.

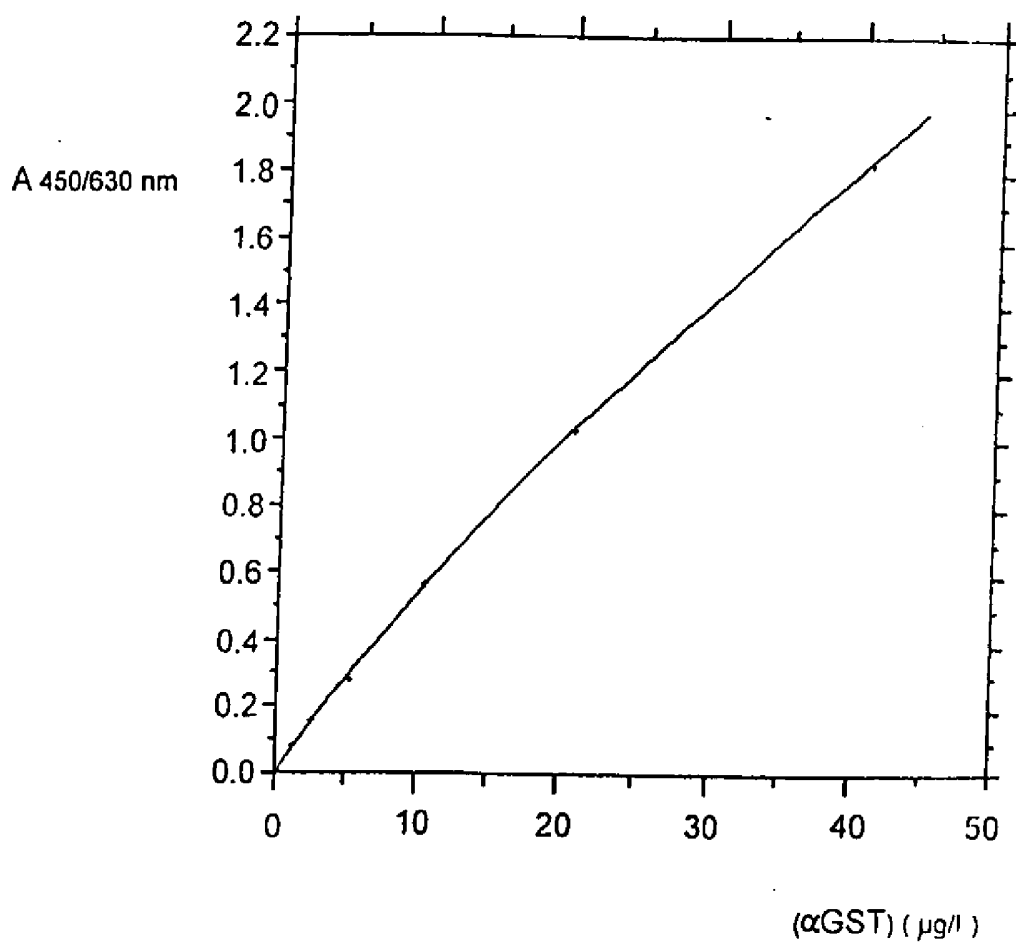
8. Způsob podle nároku 7, vyznačující se tím, že analyzovaným ^{tem} ~~parametrem~~ dárcovského orgánu je enzym.
9. Způsob podle nároku 8, vyznačující se tím, že enzymem je glutathion S-transferáza (GST).
10. Způsob podle nároku 9, vyznačující se tím, že enzymem je ~~αGST~~ alfa-GST.
11. Způsob podle některého z nároků 1 až 10, vyznačující se tím, že dárcovský orgán pochází z vepře a protilátkou je polyklonální protilátka proti prasečí ~~αGST~~ alfa-GST.
12. Způsob podle některého z předcházejících nároků, ^{4 ar 11} ~~závislého na nároku 2,~~ vyznačující se tím, že protilátkou je protilátka proti lidské ^{alfa-}αGST, která vykazuje v podstatě 100% zkříženou reaktivitu vůči prasečí ^{alfa-}αGST.
13. Způsob podle nároku 11, vyznačující se tím, že jakákoli přítomná lidská ^{alfa-}αGST se detekuje s využitím specifické proti-^{alfa-}lidské αGST v odděleném systému vzorků.
14. Způsob podle některého z předcházejících nároků, vyznačující se tím, že dárcovský materiál se testuje na viabilitu před xenotransplantací.



Obr. 1

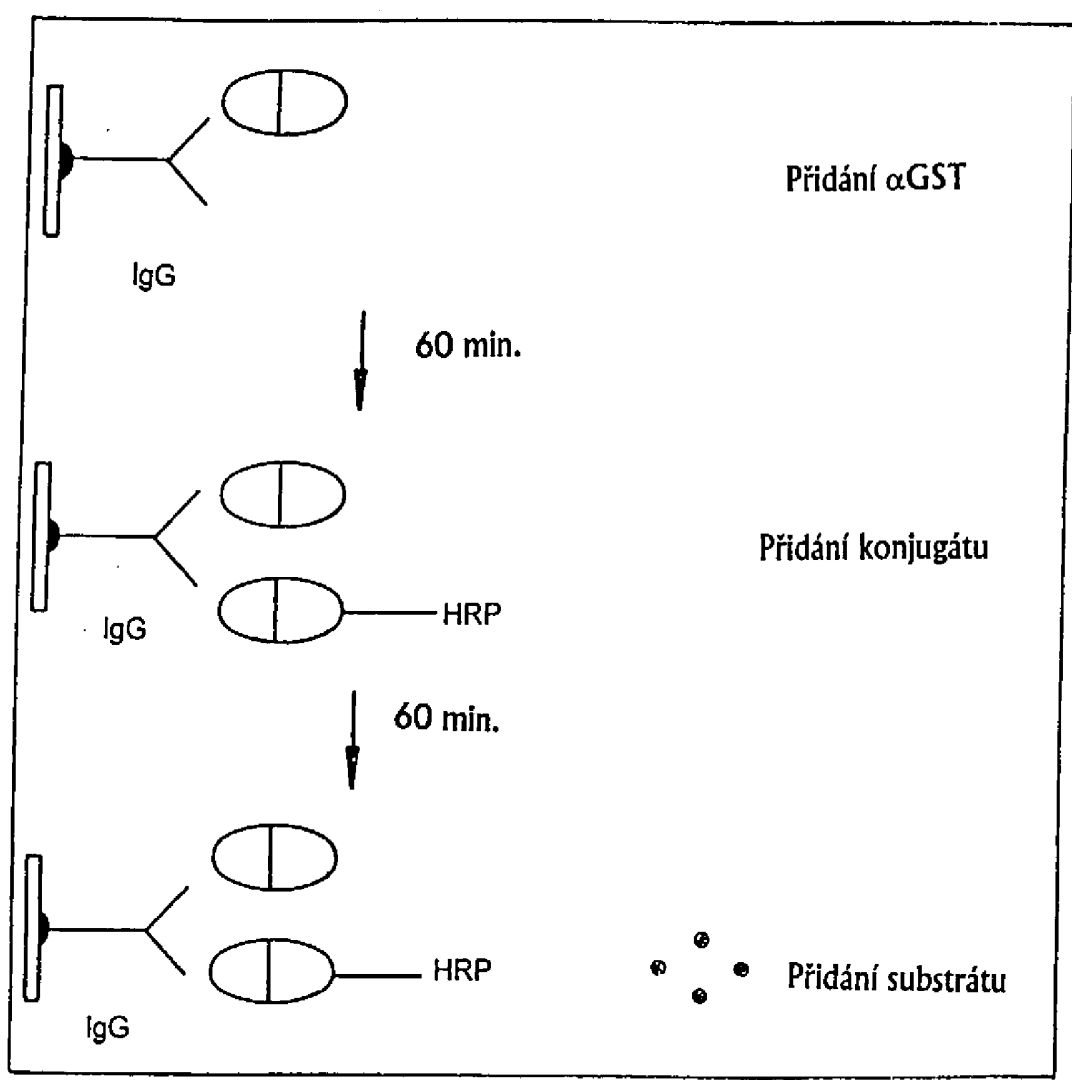
PY 1998 - 1553

2/8



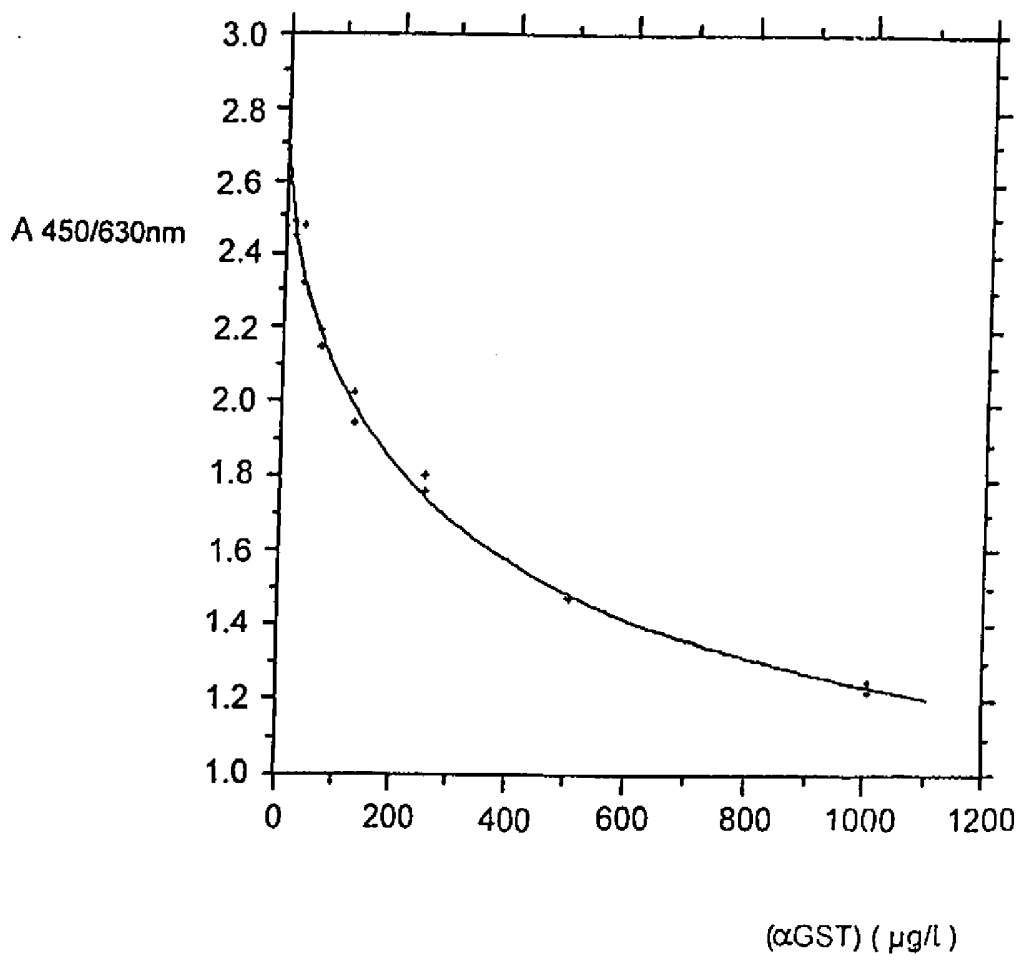
Obr. 2

3/8



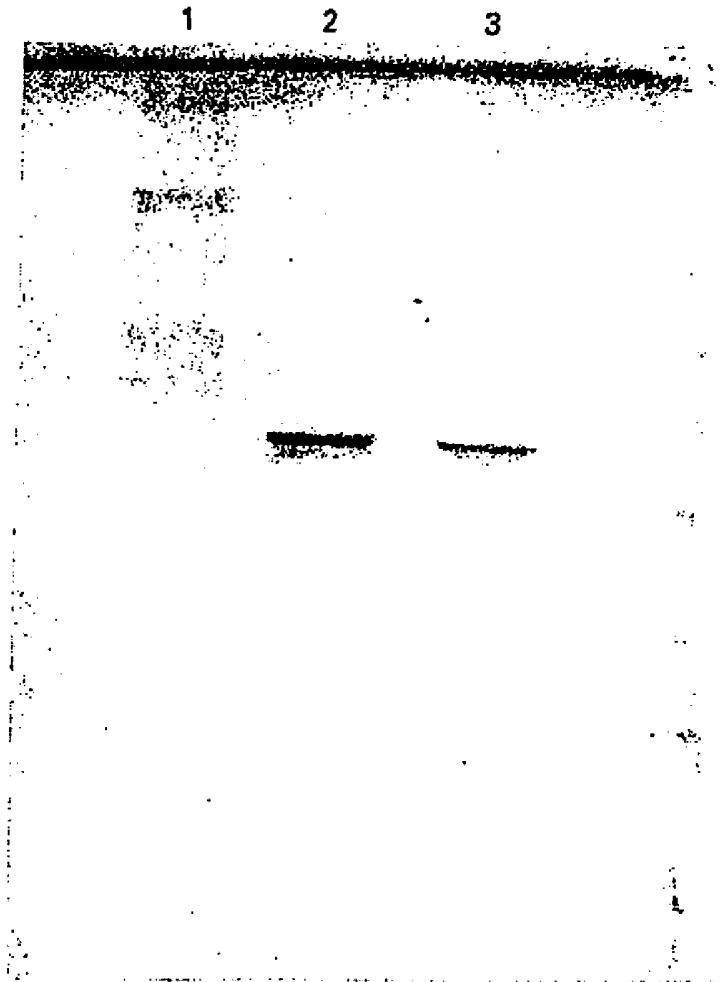
Obr. 3

4/8



Obr. 4

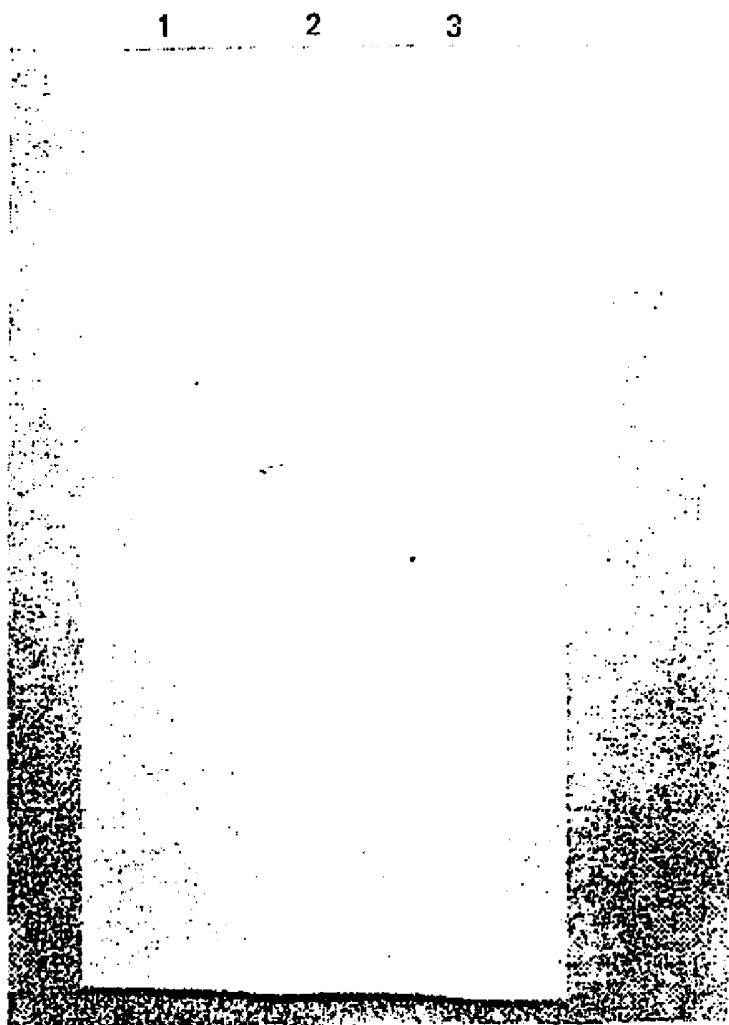
5/8



Obr. 5

6/8

PV 1998-1553



Obr. 6

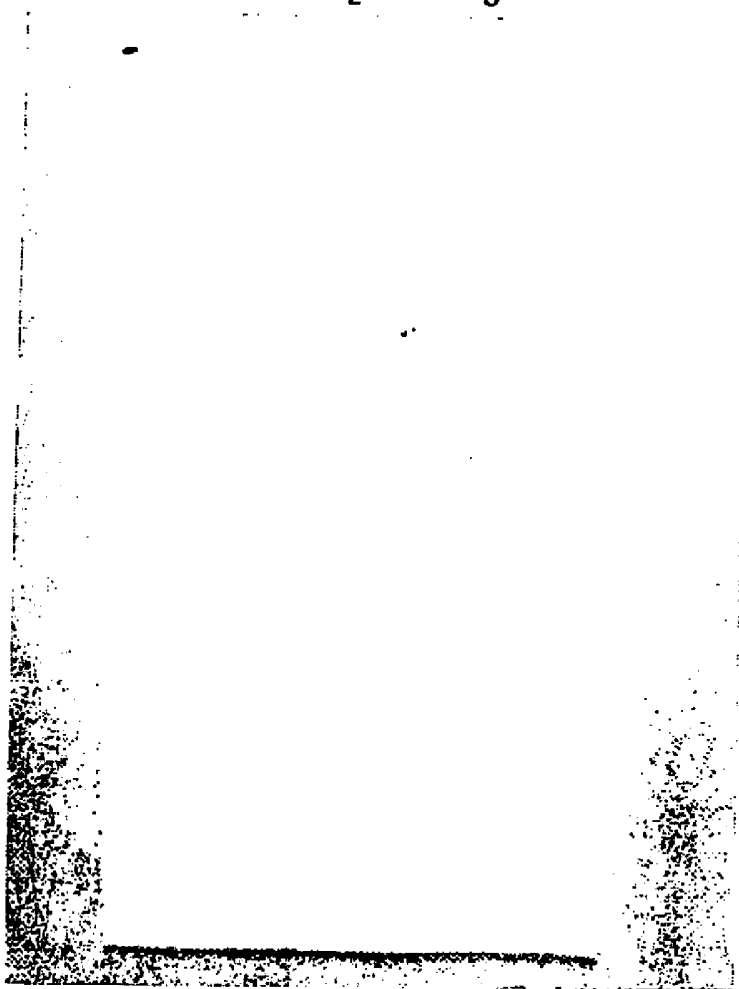
PV 1998-1553

7/8

1

2

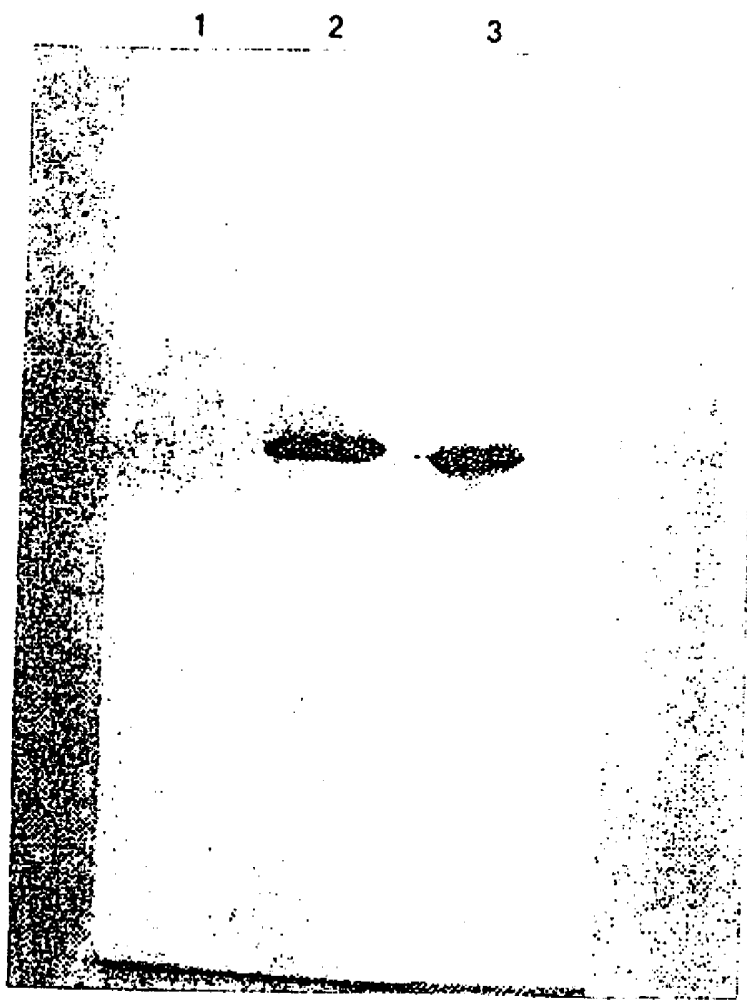
3



Obr. 7

PV 1998-155

8/8



Obr. 8