



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

254706

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴

G 01 N 33/577

(22) Přihlášeno 19 01 84

(21) PV 453-84

(40) Zveřejněno 11 06 87

(45) Vydáno 15 11 88

(75)

Autor vynálezu

JANDOVÁ ANNA MUDr. CSc., ČOUPEK JIŘÍ ing. CSc., SANITRÁK JAROSLAV ing.,
MOTYČKA KAREL RNDr. CSc., MACH OTAKAR RNDr. CSc., PEKÁREK JAN MUDr. CSc.,
PRAHA

(54) **Způsob přípravy imunologicky funkčních frakcí z lidských a zvířecích zhoubných nádorů**

Způsob spočívá v tom, že se supernatant po poslední centrifugaci při zatížení 90 až 110 x 10³ g extrahuje fenolem v objemovém poměru 1:0,5 až 1,5 v přítomnosti ionogenního tensidu a 8-hydroxychinolinu při pH 7 až 7,5 nejméně dvakrát, získaná vodná fáze obsahující směs cytoplazmatických ribonukleových kyselin se rozdělí afinitní chromatografií na koloně plněné celulórou s navázanými oligonukleotidy deoxythimidinu, polyadenylované ribonukleové kyseliny se zachytí na koloně a eluují se vodou, vodný eluát se dále dělí vysokotlakou gelovou chromatografií, sbírají se frakce o molekulové hmotnosti 3.10⁵ až 1,5.10⁴, které jsou orgánově specificky aktivní v různých, převážně imunologických testech. Získané frakce jsou použitelné jako antigeny k imunizaci a dále v různých imunologických testech pro buňkami médiíovanou imunitu, pro protisměrnou elektroforézu na agarozovém gelu, elektrofokusaci, pro značení radioizotopy, ke studiu hormonálních receptorů, pro experimentální práce v cytogenetice a genetickém inženýrství s cílem pomoci vybraných metod a antigenů stanovit včasnou diagnostiku a monitorování onemocnění.

Vynález se týká zpracování vzorků lidské i zvířecí nádorové a kontrolní takzvané zdravé tkáně. Výsledkem je imunologicky účinná antigenní frakce.

Antigen, který se získává z lidské i zvířecí nádorové tkáně i z tkání zdravých jedinců, se dále používá v různých testech. Literární údaje o způsobu, jakým se antigen připravuje, jsou často rozporné a nejednotné. Liší se a není sjednocen postup odběru materiálu při operaci. Nebývá zajištěn přesný odběr materiálu histopatologem erudovaným v příslušném oboru, například materiál pro antigen plicní by měl odbírat histopatolog pro obor plicní, pro gynekologické antigeny z oboru gynekologie atd. Vzorky nejsou uloženy v jednotné bance za jednotných podmínek zmrazení, pokud nejsou ihned zpracovány. Způsob centrifugace bývá různý (rozličné g). Získané frakce nemají standardně upravené množství proteinů a obsah imuniaktivní složky je v takto připravených preparátech různý.

Podle dosavadní praxe si jednotlivá pracoviště vyrábějí z nádorů tzv. antigeny samostatně a nejednotně. Prozatím nedošlo k dohodě o sjednocení výroby. Výsledky různých testů s takovými antigeny jsou pak sice publikovatelné, ale nesrovnatelné.

Způsob přípravy imunologicky funkčních frakcí získaných ze zhoubných nádorů, z šedé kůry mozkové u schizofreniků nebo ze srdečního svalu s infarktem myokardu postupnou centrifugací cytozolu a pomocí vysokotlaké gelové chromatografie podle vynálezu spočívá v tom, že se supernatant po poslední centrifugaci při zatížení 90 až 110 x 10³ g extrahuje fenolem v objemovém poměru 1:0,5 až 1,5 v přítomnosti iorogenního tensidu a 8 hydroxychinolinu při pH 7 až 7,5 nejméně dvakrát, získaná vodná fáze obsahující směs cytoplasmatických ribonukleových kyselin se rozdělí afinitní chromatografií na koloně plněné celulózou s navázanými oligonukleotidy deoxythimidinu, polyadenylované ribonukleové kyseliny se zachytí na koloně a eluují se vodou, vodný eluát se dále dělí vysokotlakou gelovou chromatografií, sbírají se frakce o molekulové hmotnosti 3.10⁵ až 1,5.10⁴, které jsou orgánově specificky aktivní v různých testech.

Jako mobilní fáze pro vysokotlakou gelovou chromatografii se používá fyziologický roztok, jako stacionární fáze se používá suspenzní kopolymer 2-hydroxyethylmethakrylátu s ethylendimethakrylátem s vylučovacím limitem kolony, vyjádřeným molekulovou hmotností 3.10⁵, velikost partikulí gelu je 32 až 40 μm, k detekci se používá diferenciální refraktometr a UV spektrofotometr s variabilní vlnovou délkou.

Na základě všech dosavadních zkušeností vypracovali autoři vynálezu způsob separace imunologicky aktivních frakcí z lidských i zvířecích zhoubných nádorů, který využívá k přípravě tuzemské dostupné techniky, sjednocuje postup při manipulaci s tkáněmi a vylučuje příměs proteinů, protože separuje pouze tělu vlastní nebo cizí ribonukleové kyseliny a sice v definovatelném množství (ng na ml).

Způsob podle vynálezu vede k získání materiálu s vyšší selektivitou a imunologickou aktivitou při menší spotřebě biologického výchozího materiálu a významně nižším šumem akcesorních proteinových makromolekul. Na rozdíl od jiných způsobů přípravy imunologicky aktivních frakcí se podle vynálezu získá orgánově specifický antigen.

Získané frakce jsou použitelné jako antigeny k imunizaci a dále v různých imunologických testech pro buňkami mediovanou imunitu, pro protisměrnou elektroforézu na agarozovém gelu, elektrofokusaci, pro značení radioizotopy, ke studiu hormonálních receptorů, pro experimentální práce v cytogenetice a genetickém inženýrství s cílem pomocí vybraných metod a antigenů stanovit včasnou diagnostiku a monitorování choroby.

Získané frakce jsou velice časnými (až několik let před vypuknutím onemocnění) pozitivními markery lidskému tělu a ribonukleové kyseliny, která pravděpodobně kontamínuje lidské i zvířecí nádory, šedou kůru mozkovou u schizofreniků, srdeční sval postižený infarktem myokardu, jakož i endometrium žen, které potrácejí z gynekologicky nezjistitelné příčiny a u nichž byla vyloučena jiná virová onemocnění.

Způsob přípravy imunologicky funkčních frakcí je blíže osvětlen v příkladu, který nijak neomezuje předmět vynálezu.

Příprava imunoaktivní frakce z karcinomu mammy.

Biologický materiál se odebere peroperačně za spolupráce histopatologa do sterilní nádoby, uložené v suchém ledu. Po rozmrazení se zbaví tuku, eventuálně nekrotických částí, po rozstříhání se homogenizuje a homogenát se třikrát kryolyzuje při -60 a $+40$ °C. Poté se centrifuguje při zatížení $3,5 \cdot 10^3$ g při teplotě $+4$ °C po dobu 40 min. Supernatant se znovu podrobí centrifugaci při zatížení 10^5 g při teplotě $+4$ °C po dobu 60 min. Získaný supernatant, který obsahuje bílkoviny, nukleoproteiny, nukleové kyseliny a nízkomolekulární komponenty, se 15 min při teplotě místnosti extrahuje fenolem v objemovém poměru 1:1 v přítomnosti natriumdodecylsulfátu o hmotnostní koncentraci 1 % z 0,01 % hmot. 8-hydroxychinolinu a pH se upraví na 7 až 7,5.

Pomocí centrifugy při zařazení $3 \cdot 10^3$ g se oddělí vodná fáze, která se opět třepe s fenolem. Získaná vodná fáze obsahující směs cytoplasmatických ribonukleových kyselin se dále dělí na koloně naplněné oligo dT celulózą (celulóza s navázanými oligonukleotidy deoxythimidinu), která má afinitu k polyadenylovaným zbytkům, charakteristickým pro informační ribonukleové kyseliny. Na koloně zachycené polyadenylované ribonukleové kyseliny se promyje vodou, vodný eluát se dále purifikuje vysokotlakou gelovou chromatografií. Kolona je naplněna gelem Separon-Hema-300 glc^R, který je suspenzním kopolymerem 2-hydroxyethyl-methakrylátu a ethylendimethakrylátu s vylučovacím limitem $3 \cdot 10^5$.

Detekce se provádí pomocí diferenciálního refraktometru R 043 a UV průtokového spektrofotometru s variabilní vlnovou délkou. Jako mobilní fáze se používá fyziologický roztok. Imunologicky aktivní a orgánově specifický antigen se získá v oblasti odebraného eluátu 25 až 50 cm³ při vlnové délce 340 nm.

Stejným způsobem se odebírá materiál z jakékoliv experimentální i lidské nádorové i kontrolní zdravé tkáně, z šedé kůry mozkové schizofreniků i zdravých osob, ze srdečního svalu s infarktem myokardu i zdravého, přičemž u potrácejších žen se použije jako antigen materiál zhotovený z lidského karcinomu endometria a stejným způsobem se zpracuje.

P R Ě D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob přípravy imunologicky funkčních frakcí z lidských a zvířecích zhoubných nádorů, popřípadě z šedé kůry mozkové schizofreniků nebo ze srdečního svalu s infarktem myokardu, postupnou centrifugací cytozolu a pomocí vysokotlaké gelové chromatografie, vyznačující se tím, že se supernatant po poslední centrifugaci při zatížení 90 až $110 \cdot 10^3$ g extrahuje fenolem v objemovém poměru 1:0,5 až 1,5 v přítomnosti ionogenního tensidu a 8-hydroxychinolinu při pH 7 až 7,5 nejméně dvakrát, získaná vodná fáze obsahující směs cytoplasmatických ribonukleových kyselin se rozdělí afinitní chromatografií na koloně plněné celulózą s navázanými oligonukleotidy deoxythimidinu, polyadenylované ribonukleové kyseliny se zachytí na koloně a eluují se vodou, vodný eluát se dále dělí vysokotlakou gelovou chromatografií a sbírají se frakce o molekulové hmotnosti $3 \cdot 10^5$ až $1,5 \cdot 10^4$, které jsou imunologicky a orgánově specificky aktivní.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že jako mobilní fáze pro vysokotlakou gelovou chromatografii se používá fyziologický roztok, jako stacionární fáze se používá suspenzní kopolymer 2-hydroxyethylmethakrylátu s ethylendimethakrylátem s vylučovacím limitem $3 \cdot 10^5$ o velikosti částic gelu 32 až 40 μ m.