



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

221747

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 P 19/04

(22) Prihlášené 08 03 82
(21) (PV 1557-82)

(40) Zverejnené 15 09 82

(45) Vydané 15 05 85

(75)

Autor vynálezu

ŠANDULA JOZEF RNDr. CSc., KUNIAK ĽUDOVÍT ing. CSc.,
MASLER LADISLAV ing. CSc., BRATISLAVA

(54) Spôsob prípravy imunosorbentov z polysacharidov izolovaných z kvasiniek

Vynález sa týka odboru chémie, biochémie, imunológie a mikrobiológie.

Účelom vynálezu je príprava nerozpusteného imunosorbenta z polysacharidov izolovaných z kvasiniek, ktorý má tú vlastnosť, že je schopný sorpčne viazať na svojom povrchu bielkovinové protilátky proti rôznym hubovitým ochoreniam.

Uvedeného účelu sa dosiahne tak, že polysacharid izolovaný z kvasinkovitých buniek sa sietuje v alkalickom prostredí bifunkčným reagentom najvýhodnejšie s epichlórhydrínom v množstve 15 až 30 % hmot. na hmotnosť suchého polysacharidu pri teplotách do 50 °C. Po zosietení sa nerozpustný polysacharidový gél suspenduje na rýchloobrátkovom mixéri vo vode na častice o veľkosti 80 až 250 mikrónov, ktoré sa potom odfiltrujú, dobre premyjú vodou a voda sa vytesní organickým rozpúšťadlom s výhodou etanolom alebo acetonom.

Zosietený vysušený polysacharidový imunosorbent má napúšťací objem vo vode 4 až 8 ml/g a je vhodným nosičom pre izoláciu a purifikáciu protilátok účinných proti rôznym hubovitým ochoreniam.

Vynález má využitie v humánnej i veterinárnej medicíne pri izolácii protilátok proti rôznym hubovitým ochoreniam.

Vynález sa týka spôsobu prípravy imunosorbentov z polysacharidov izolovaných z kvasiniek.

Hlavnou imunologicky aktívnou zložkou kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov sú manány, alebo manózu obsahujúce heteropolysacharidy ako galaktomanány, glukomanány, glukorónoxylomanány, ktoré sa nachádzajú na povrchu buniek týchto mikroorganizmov. Manány patogénnych druhov rodu *Candida* sú vysokomolekulové polysacharidy, ktoré majú v hlavnom reťazi $\alpha(1-6)$, v bočných reťazoch $\alpha(1-2)$, prípadne $\alpha(1-3)$ glykozidické väzby. Imunodominantnou skupinou týchto antigénov sú bočné reťazce skladajúce sa z 5-6 manózových jednotiek viazaných (1-2) glykozidickými väzbami (S. Suzuki a H. Sunayama: Jap. J. Microbiol. 13, 95 /1969/).

Imunologicky aktívne polysacharidy mikroorganizmov sa izolujú zo živného média niekoľkonásobným zrážaním etanolom, z biomasy kvasiniek extrakciou s hydroxidom draselným o koncentrácii 2 % hmot. (P. A. J. Gorin a J. F. T. Spencer: Adv. Appl. Microbiol., 13, 25 /1970/) alebo s 0,2 M chloridom sodným (O. Šíkl a spol.: Coll. Czechoslov. Chem. Commun., 35, 2 969 /1970/) pri zvýšenej teplote. Čisté manány sa získavajú následným niekoľkonásobným zrážaním rozpustných polysacharidov Fehlingovým roztokom. Výťažky imunologicky aktívnych manánov sú však veľmi nízke a vzhľadom na pôvodnú biomasu nepresahujú 5 % hmot.

Manány patogénnych kvasinkovitých mikroorganizmov sú vo vode dobre rozpustné a nedajú sa priamo použiť na prípravu pevných sorbentov. Aby sa získali vhodné nerozpustné sorbenty je potrebné polysacharidy z kvasinkovitých mikroorganizmov vhodne modifikovať sietovaním (L. Kuniak, R. H. Marchesault: Starch 24, 110 /1972/), a to tak, aby imunodominantné skupiny polysacharidu boli zachované pre imunosorpciu špecifických protilátok z krvného séra. Molekulová hmotnosť manánov polysacharidov kvasinkovitých mikroorganizmov je relatívne nízka a pohybuje sa medzi 15 000 až 30 000. Na jednej molekule polysacharidu sa nachádza niekoľko determinantných skupín, avšak len časť z nich sa zúčastňuje špecifickej imunologickej reakcie antigén - protilátka. (J. Šandula a M. Vojtková: Folia Microbiologica, 19, 94 /1974/). Zosietovanie manánu dochádza ešte k hustejšiemu rozloženiu determinantných skupín v makromolekule manánu, takže časť aktívnych centier imunosorbenta sa nezúčastňuje interakcie antigén - protilátka z priestorových dôvodov.

Imunologicky aktívne manány sa vyskytujú v bunkových stenách kvasiniek v komplexe s bielkovinami a imunologicky neaktívnym glukánom (C. E. Ballau: Adv. Microbiol. Phys. 14, 93 /1976/). Úplné odstránenie týchto sprievodných biopolymérov narádza na ťažkosti a vyžaduje zložitý purifikačný proces. Zistili sme, že pre prípravu účinného imunosorbentu nie je potrebné manán úplne purifikovať, malé množstvo bielkoviny a glukánu nie je na závädu. Purifikačnými stupňami jednak klesá výťažok polysacharidu, klesá jeho molekulová hmotnosť čo sťažuje účinné zosietovanie polysacharidu a nie zanedbateľnou mierou klesá počet imunodominantných skupín schopných viazať homológne protilátky, preto je výhodnejšie použiť polysacharid len čiastočne purifikovaný s vyššou molekulovou hmotnosťou.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že polysacharid izolovaný z kvasinkovitých mikroorganizmov s výhodou *Candida albicans* alebo *Candida tropicalis* sa v prvom stupni zosietuje bifunkčným sietovacím reagentom s výhodou 1-chlór-2,3-epoxypropanom v množstve 15 až 30 % hmot. na hmotnosť polysacharidu v alkalickom prostredí a v druhom stupni sa zosietovaný polysacharidový gél podrobí vodnej dispergácii vo vysokoobrátkovom mixéri za súčasnej neutralizácie voľných alkálií a v treťom stupni sa premyté nerozpustné polysacharidové častice odvodnia na filtrí alkoholem a vysušia pri teplote do 60 °C.

Takto pripravený nerozpustný polysacharid s veľkosťou častíc 80 až 250 μm je vhodným imunosorbentom pre izoláciu protilátok proti rôznym hubovitým ochoreniam.

Najčastejším pôvodcom mykotických ochorení u ľudí je *Candida albicans*, na ktoré pripadá vyše 80 % patologických mikrobiologických nálezov. Zbytok tvoria mikroorganizmy ako

Candida tropicalis, *C. stellatiodea*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. famata* a iné. Mnohé druhy *Candida* majú totožné alebo podobné antigénne zloženie ako *C. albicans*, sérologicky sú ťažko rozlíšiteľné a na mikroorganizmy tejto sérologickej skupiny pripadá až 90 % všetkých kandidóz. Vzhľadom na to, že mnohé *Candida albicans* sú silno patogénne, tak ich kultivácia za účelom prípravy imunologicky aktívnych polysacharidov sa musí robiť za prísne sterilných podmienok, čo zvyšuje náklady prípravy biomasy.

Preto je výhodné pre tieto účely použiť kmeň *C. tropicalis*, ktorý sa priemyslovo používa na výrobu krmného droždía, je nepatogénny alebo len málo patogénny a navyše dobre sa kultivuje na rôznych odpadných lignocelulóзовých materiáloch. Manán z *C. tropicalis* použitý ako imunosorbent zachytí protilátky séra homologického druhu ako aj špecifické látky vytvorené mikroorganizmami voči manánu uvedenej séro-skupiny.

Sieťovanie polysacharidu z buniek kvasinkovitých mikroorganizmov je výhodné prevádzkať za takých reakčných podmienok, že optimálne množstvo sieťovacieho reagentu je 10 až 30 % hmot. na hmotnosť suchého polysacharidu, pri koncentrácii 5 až 8 % hydroxidu sodného ako alkalického katalyzátoru a koncentrácia polysacharidu v reakčnom médiu má byť 15 až 30 % hmot. aby sa získal gél a napúšťacím objemom 4,5 až 8,0 ml/g polysacharidu. Sieťovanie je výhodné viesť najprv pri teplote 20 až 30 °C po dobu 1 až 2 hodín a v druhom stupni reakčnú teplotu zvýšiť na 50 °C pri ktorej teplote je reakcia ukončená za 1 hodinu. Zosieťovaný polysacharid sa podrobí mokrej defibrácii v rýchloobrátkovej miešačke. Aby sa dosiahla optimálna veľkosť častíc (80 až 250 mikrónov) obvyčajne stačí doba 30 až 60 sekúnd podľa výšky obrátok defibrátora. Pred defibráciou je účelné do vodného média pridať kyselinu octovú na neutralizáciu voľných alkálií. Bez neutralizácie by sa získal veľmi jemný gél, ktorý zle filtruje a nie je vhodný pre prácu na kolóne.

Najväčšou výhodou nového postupu je však skutočnosť, že umožňuje pripraviť nový vysokoučinný imunosorbent, pomocou ktorého sa dajú izolovať v princípe jednoduchým spôsobom žiadane protilátky z biologických materiálov, ktorých izolácia inými postupmi je podstatne nákladnejšia a zložitejšia.

Nový postup má ďalšie výhody v tom, že používa nepurifikovaný polysacharid, ktorý po zosietení má dostatok voľných imunologicky aktívnych skupín schopných efektívne viazať protilátky z biologických materiálov.

Ďalšou podstatnou výhodou je, že môže vychádzať i z nepatogénnych kmeňov, ktoré sa priemyslovo využívajú pre produkciu krmných kvasníc, čo podstatnou mierou zlepšuje ekonomickú stránku výrobného postupu.

Ďalšie prednosti a detaily nového postupu sú zrejmé z príkladovej časti postupu, ktorá nie je vyčerpávajúca, ale len demonštrujúca podstatné znaky nového postupu prípravy imunosorbenta vhodného na izolovanie protilátok proti mykotickým ochoreniam spôsobenými kvasinkovitými mikroorganizmami rodu *Candida*.

P r í k l a d 1

10 g surového, suchého polysacharidu izolovaného z buniek kvasinkovitých mikroorganizmov *Candida tropicalis* sa zvlhčí s 20 ml destilovanej vody a nechá sa 5 až 10 minút napučiavať. Potom sa pridá 4 ml hydroxidu sodného o koncentrácii 40 % hmot. dobre sa zamieša a nechá sa rozpúšťať, až je roztok homogénny bez zjavných nerozpustných častíc, čo obvyčajne netrvá viac ako 10 až 15 minút. Potom sa pridá 3 ml 1-chlór-2-3 epoxipropánu (epichlórhydrín) a dobre sa zamieša tak, aby sieťovací reagent bol homogénne distribuovaný v celom objeme reakčnej zmesi. Reakčnú baňku uzavrieme a necháme reagovať pri teplote laboratória 1 až 2 hodiny, potom zvýšime teplotu postupne na 50 °C a pri tejto teplote necháme reakčnú zmes reagovať bez miešania 1 hodinu, načo zosieťovaný polysacharidový gél mixuje-

me vo vode (do ktorej sa pridá kyselina octová na neutralizáciu voľných alkálií) asi 30 až 60 sekúnd v rýchloobrátkovom mixéri, na častice o veľkosti 80 až 250 μm . Nerozpustný polysacharidový gél sa niekoľkonásobne dekantuje od najjemnejších podielov, ktoré by veľmi zvyšovali odpor pri práci v kolóne. Dekantované a dokonale premyté gélové častice sa na filtri odvodnia postupne etanolom, resp. acetónom a vysušia pri teplote do 60 $^{\circ}\text{C}$. Napúšťací objem pripraveného imunosorbentu je okolo 6 až 7 ml/g a je vhodný pre imunosorbenciu protilátok z biologických tekutín.

Pr í k l a d 2

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že pri sietovaní použijeme polovičné množstvo vody, hydroxidu sodného a sietovacieho reagenta, pričom získame polysacharidový gél s napúšťacím objemom 4 až 5 ml/g. Gél má lepšie hydrodynamické vlastnosti pri práci na kolóne pri nezmenenej absorpčnej kapacite protilátok.

Pr í k l a d 3

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že ako imunologicky aktívny polysacharid sa použije polysacharid izolovaný z mikroorganizmu *Candida albicans*. Zosietený polysacharid má obdobné vlastnosti ako zosietený polysacharid izolovaný z *Candida tropicalis*.

Pr í k l a d 4

Postup ako v príklade 1 s tým rozdielom, že sa pre sietovanie použil 3-násobne prečistený polysacharid z *Candida tropicalis*. Roztok polysacharidu bol málo viskózný pri rovnakej koncentrácii a veľmi zle sa sietoval, mal vysoký napúšťací objem po zosietení a pri práci na kolóne sa čiastočne rozpúšťal. Pre izoláciu protilátok sa ukázal ako nevhodný. Tento príklad slúži ako zrovnávací príklad, ktorý dokumentuje, že pre imunosorbenty je výhodnejší surový, nepurifikovaný polysacharid z kvasinkovitých mikroorganizmov.

Popísaná metóda prípravy imunosorbentov z mikrobiálnych polysacharidov je univerzálna, môže byť použitá nielen pre kandidy, ale pre Tubovoľný imunologický aktívny polysacharid.

Vynález má použitie v zdravotníctve pri dôkaze, izolácii a purifikácii účinných protilátok z biologického materiálu pri mykotických ochoreniach ako i v alergológii.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob prípravy imunosorbentov (imunoafinantov) z polysacharidov izolovaných z kvasiniek vyznačený tým, že polysacharid izolovaný z kvasinkovitých mikroorganizmov s výhodou druhu *Candida albicans* alebo *Candida tropicalis* sa v prvom stupni zosieťuje bifunkčným sietovacím reagentom s výhodou 1-chlór-2-3 epoxypropánom v množstve 15 až 30 % hmot. na hmotnosť polysacharidu v alkalickom prostredí a v druhom stupni sa zosietený polysacharidový gél podrobí vodnej dispergácii vo vysokoobrátkovom mixéri za súčasnej neutralizácie voľných alkálií a v treťom stupni sa premyté nerozpustné polysacharidové častice odvodnia na filtri etanolom a vysušia pri teplote do 60 $^{\circ}\text{C}$.