



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

265 438

(11) (B1)
(13)

(51) Int. Cl.⁴

A 61 K 39/395 //
A 61 K 35/16

(22) Přihlášeno 10 03 88

(21) PV 1565-88.R

(40) Zveřejněno 12 01 89

(45) Vydáno 15 12 89

(75)

Autor vynálezu

KOŘÍNEK JAROSLAV, PRAHA, TADRA MILOŠ, ROKYTNICE nad Jizerou

(54) Způsob výroby diagnostického séra pro stanovení C 4 globulinu

(57) Monospecifické reakce diagnostického séra se dosáhne i při zjednodušené preparaci a purifikaci C 4 globulinu tak, že k jednomu litru smíšeného lidského séra zmrazeného nejméně 3 měsíce při -15 °C se přidají 2 litry 1% roztoku 2-ethoxy-6,8-diaminoakridin-laktátu (rivanolu), sraženina se za 48 hodin rozpustí při +4 °C v 0,3M chloridu sodném a v řadě 0 až 0,02 až 0,04 až 0,1 až 0,2 až 0,3 až 0,5 až 1,0 až 2,0 ml frakce se přidá k 1 ml séra prasete, kozy nebo králíka, jemuž byl injikován lidský C 4 globulin. Imunoelktroforeticky se stanoví nejmenší hodnota přidavku potřebná k dosažení specifické reakce s lidským sérem. Po přidavku frakce k anti-séru se imunoprecipitát oddělí při +4 °C za 24 hodin filtrací a diagnostické sérum se do týdne finalizuje buď lyofylizací, nebo se z něj připraví imunoglobulin, eventuálně specifická protilátka.

Vynález řeší problém výroby diagnostického séra pro stanovení C 4 globulinu - čtvrté složky komplementu - po stránce monospecifičnosti výsledného produktu a po stránce hospodárnosti technologického postupu.

Výroba je založena na poznatcích Müller-Eberharda H. a Bira C. E.: "Isolation and description of the fourth component of human complement", uveřejněných v J. Exp. Med. 118, 447-466, 1963 a zejména pak autorů Satoshi Shiraishi a Roberta M. Strouda: "Cleavage products of C 4b produced by enzymes in human serum", uveřejněných v Imunochemistry 12, 935-939, 1975, přičemž tito autoři pomocí monospecifického diagnostického séra prokázali heterogenitu C 4 globulinu a jeho štěpení účinkem sérových a plazmových působků. Monospecifická antiséra tito autoři získali opakovaným srážením normálního lidského séra síranem sodným při 14 a 18% nasycení, s následující dialýzou, chromatografií na sloupci dietylaminoethylcelulózy.

Další purifikací frakcí zahuštěných ultrafiltrací pasážovaných na sloupci sepharóзовého gelu C6B s kovalentně vázaným lidským IgG bromkyanovou metodou získali stupňovou eluci C 4 globulin, který pak dvakrát purifikovali preparativní akrylamidovou elektroforézou. Proužky práškového akrylamidového gelu spolu s eluáty těchto gelů injikovali kozám s kompletním Freundovým adjuvans. Nevýhodou postupu je pracnost, která je pro využití v průmyslovém měřítku velmi nevýhodná. Proto se výrobci C 4 diagnostika snaží o zjednodušení například použitím vysokotlaké chromatografie při preparaci C 4 globulinu, která má lepší separační vlastnosti, než chromatografie obyčejná, a vypouštějí jeden, nebo i více separačních stupňů, hlavně preparativní elektroforézu, která má relativně malou kapacitu po stránce kvantity C 4 globulinu.

Vynecháním popsaných preparačních stupňů se velmi výrazně přesunuje těžiště obtížnosti a pracnosti do vysycovací fáze výrobního procesu, která spočívá v kontrolovaném přidávku výběrových bílkovinných materiálů preparovaných z lidského séra nebo plazmy k séru zvířat, jimž byl C 4 globulin injikován. Tímto procesem se dosahuje požadované monospecifičnosti tak, aby diagnostická imunoreagens dosáhla požadovaných kvalitativních i kvantitativních parametrů uznávaných v daném období vědeckého poznávání.

Proces vysycování je odborně vysoce náročný, vyžaduje kombinaci různých bílkovinných materiálů, přičemž každé individuální zvířecí sérum vyžaduje po stránce kvality i kvantity různě velké přídavky. Nejzávažnější však je, že vysycování selhává v případech, kdy nelze v dostatečném kvantu získat vhodné materiály. Tak v konkrétním případě se s dodržení platného výrobního předpisu vypracovaného v průběhu výzkumného úkolu, nahromadilo mnoho desítek litrů zvířecího (prasečího) séra z mnoha skupin prasat, imunizovaných C 4 globulinem. Jsou to zejména proteiny patřící k třetí složce komplementu a bílkoviny nábojově a difúzně blízké C 4 globulinu, které se z imunogénu obtížně oddělují, a které u imunizovaných zvířat navozují protilátky nežádoucí.

V době před podáním přihlášky vynálezu bylo ohroženo splnění plánu výroby C 4 diagnostika požadovaného jak naším zdravotnictvím, tak i zahraničními odběrateli. Utilizace takového surového zvířecího séra je vzhledem k vynaložené práci žádoucí, a z podstaty jevu lze právem usuzovat, že s těmi problémy se setkávají i výrobci zahraniční.

Podstatou vynálezu je způsob výroby diagnostického séra pro stanovení C 4 globulinu vyznačený tím, že na jeden objemový díl lidského séra nebo plazmy, skladovaných minimálně 3 měsíce při -15°C ve zmraženém stavu, aby tak došlo ke spontánní konverzi C 3 globulinu na beta-1 A globulin se působí jedním až čtyřmi díly 0,3% až 2% roztoku 2-ethoxy-6,8-diaminoakridinlaktátu (rivanolu), sraženina se promyje destilovanou vodou a eluuje se nadbytkem 0,15 M až 1,5 M chloridu sodného, přičemž v průběhu stání směsi při $+4^{\circ}\text{C}$ se oddělí roztok bílkovin od tuhé fáze a získá se dekantací. Tekutina obsahuje prakticky veškerý sérový beta-1 A globulin a některé další bílkoviny, které jsou zvláště potřebné k dosažení požadované monospecifičnosti diagnostického C 4 antiséra.

K řadě vzorků séra prasete, kozy, nebo králíka, jimž byl injikován C 4 globulin, se přidá stoupající objem získané frakce. Po jedné hodině stání se získají supernatanty odstředěním,

a testují se imunoelektroforézou, přičemž ve startovních jamkách je umístěno lidské sérum, v kanálcích supernatanty. Stanoví se nejmenší hodnota přídávku, potřebná k dosažení monospecifičnosti C 4 diagnostika. Vypočtený objem rivanolové frakce se pak přidá k požadovanému velkému objemu zvířecího séra a výsledek se znovu kontroluje imunoelektroforézou, případně i dalšími metodami, jako radiální imunodifúzí, raketkovou metodou podle Laurella, a podobně. Vysrážený imunoprecipitát se za 24 hodin odstředí, sérum se přefiltruje a nejpozději po týdnu stání při +4 °C se finalizuje buď lyofilizací, nebo separací imunoglobulinu, nebo protilátky. V případě potřeby lze rivanolovou frakci snadno polymerovat glutaraldehydem a vysycovací dávku stanovit dávkováním vločkového surbentu k surovému antiséru; po 24 hodinách stání se vločky odstraní zachycením sítím.

Vynález dosahuje nového a vyššího účinku ve výrobě diagnostického séra v podstatném zjednodušení výrobního procesu, neboť eliminuje vyhledávání, zkoušení a pokusné kombinování různých nekonstantních frakcí v procesu vysycování a omezuje práci na jednoduchou přípravu vysycovacího materiálu konstantního složení, libovolně dostupného v požadovaných objemech, přičemž jako zdroje může být použito směsi dárcovského séra nebo i plazmy po různých vyšetřeních, což je v podstatě odpadový sběrový materiál, získávaný z hematologických a transfúzních pracovišť. Při odborné realizaci vynálezu se vysycení omezuje na jednoduchý a téměř mechanicky prováděný úkon a kvalita produktu splňuje nejpřísnější kritéria monospecifičnosti. Výhoda vynálezu se uplatní i při ideálním výsledku purifikace C 4 imunogénu, tím více však vystoupí do popředí, čím více se purifikace imunogénu zjednoduší. V krajním případě při přílišném zjednodušení, nebo i nezdařené purifikaci C 4 globulinu je využití vynálezu rovněž možné a lze tak zachránit i surová zvířecí antiséra, která by jinak přišla nazmar.

Je však nutno počítat s velkými dávkami vysycení a s pozorovatelným zeslabením protilátky specifické, již je pak nutno posílit zahuštěním na vyšší koncentraci k dosažení požadovaného titru. Různá individuální séra imunizovaných zvířat se tedy po imunizaci liší jen různě velkým přídatkem při vysycování, aniž by bylo třeba připravovat, zkoušet a kombinovat nějaké jiné materiály. Využití vynálezu má prokazatelné výhody v ekonomice výroby.

Příklad konkrétního provedení výrobního postupu: k jednomu litru smíšeného séra dárců krve, které bylo uchováno půl roku ve zmraženém stavu při -15 °C, bylo po rozmražení na teplotu 20 °C přilito 2 000 ml 1% vodného roztoku 2-ethoxy-6,9-diaminoakridinlaktátu, směs ponechána 24 hodin v lednici při +4 °C, tekutina nad sraženinou dekantována, sraženina promyta nadbytkem destilované vody, rozmíchána se dvěma litry 0,3M chloridu sodného, uložena do lednice a s občasným promícháním ponechána 48 hodin při +4 °C. Po této době byla čirá tekutina nad tunou fází slita a pipetována k řadě vzorků prasečího séra, získaného injikováním prasat C 4 globulinem, a to ve stoupajících objemech v řadě 0 až 0,02 až 0,04 až 0,1 až 0,2 až 0,3 až 0,5 až 1,0 až 2,0 ml frakce na 1 ml zvířecího séra. Vzorky byly po 1 hodině stání a odcentrifugování imunoprecipitátu analyzovány z kanálků imunoelektroforetické desky, na níž bylo předběžně ze startovních jamek rozděleno lidské sérum normální ze startovních jamek, za podmínek standardní imunoelektroforézy. Hodnota 0,2 ml frakce, která postačovala k dosažení monospecifičnosti v imunoelektroforéze, byla přepočtena na 4 litry prasečího séra. Po přídávku 800 ml k tomuto objemu séra byla směs ponechána 24 hodin v lednici při +4 °C a imunoprecipitát odfiltrován mikrobiologickým filtrem. Výsledek vysycení byl pak ověřen imunoprecipitačními metodami a předán k dalšímu zpracování.

Využití vynálezu je mnohostranné: diagnostické sérum připravené podle vynálezu je vhodné pro kvalitativní průkaz C 4 globulinu v různých biologických materiálech, ke sledování desaktivace komplementárních složek vzniklých štěpením C 4, k diagnostickým účelům pro kvantitativní stanovení imunoprecipitačními metodami, k testům imunofixačním, a to buď v podobě upraveného zvířecího séra přímo, nebo v podobě izolovaného imunoglobulinu třídy G, v nejdokonalejší formě pak (což bylo pokusně prověřeno) v podobě vytříděného souboru imunoglobulinových molekul se specifickou afinitou k C 4 globulinu, které lze široce využívat v imunochemické, biochemické, imunochematologické a laboratorně diagnostické praxi, a značkovat enzymem nebo radioaktivními prvky.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby diagnostického séra pro stanovení C 4 globulinu vyznačený tím, že na jeden objemový díl lidského séra nebo plazmy se působí jedním až čtyřmi objemovými díly 0,3% až 2% roztoku 2-ethoxy-6,8-diaminoakridinlaktátu, sraženina se rozpustí nadbytkem 0,15 M až 1,5 M roztoku chloridu sodného, získaný roztok se přidá v experimentálně stanoveném objemu k séru prasete, kozy nebo králíka, jimž byl injikován lidský C 4 globulin a vysrážený imunoprecipitát se odstředí, nebo odfiltruje.