



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **80774** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
C12N 5/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 14673	(72) Винахідник(и): Галкін Олександр Юрійович (UA), Дуган Олексій Мартем'янович (UA)
(22) Дата подання заявки: 21.12.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.06.2013	(73) Власник(и): Галкін Олександр Юрійович, вул. Героїв Космосу, 1а, кв. 65, м. Київ, 03148 (UA), Дуган Олексій Мартем'янович, бул. Лесі Українки, 24, кв. 27, м. Київ, 01042 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.06.2013, Бюл.№ 11	

(54) СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ IgE ЛЮДИНИ

(57) Реферат:

Спосіб виділення IgE людини включає вилучення із сироватки IgG людини за допомогою афінної хроматографії на протеїні G, вилучення із сироватки IgA та IgM людини за допомогою імуноафінних сорбентів на основі анти-IgA та анти-IgM моноклональних антитіл, виділення IgE людини двоетапною гель-фільтрацією на супердексі 200, контроль якості отриманого імуноглобуліну у імунодифузії за Оухтерлоні, електрофорез у поліакриламідному гелі у редуруючих умовах.

UA 80774 U

Корисна модель належить до імунохімії, біохімії та біотехнології і може бути використана для специфічного виділення IgE людини високого ступеня чистоти, придатних для використання в імуноаналізі.

Для вирішення багатьох задач в імунології та молекулярній медицині виникає потреба в очищених препаратах імуноглобулінів. IgE використовуються як імуногени для імунізації, а також для створення імуносорбентів, призначених для видалення перехресно реагуючих антитіл та афінної очистки поліклональних антиімуноглобулінових сироваток. Очищені IgE можуть виступати як стандартні антигени при їх кількісному визначенні, а також необхідні для перевірки відповідних імунних сироваток [1]. Для виділення та очистки імуноглобулінів звертаються до широкого арсеналу методів молекулярної імунології та біохімії. При цьому всі підходи базуються на застосуванні фізико-хімічних та біологічних властивостей даної групи молекул. Найчастіше використовують наступні відмінності антитіл різних класів від інших молекул, що присутні у сироватці, а саме: молекулярну масу, спорідненість до низки протеїнів (білки A та G), ізоелектричну точку (pI), розчинність за різних умов. На використанні зазначених відмінностей біомолекул базуються методи гель-фільтрації, афінної та іонообмінної хроматографії, діалізу, осадження солями та органічними розчинниками. Більшість підходів, що зустрічаються у літературі [2-4], передбачають поєднання декількох методів. Цікавим є й той факт, що дані різних авторів [2-6] суттєво різняться щодо значень деяких фізико-хімічних властивостей імуноглобулінів, наприклад pI для різних ізотипів. Відповідно виникають проблеми при формуванні методологічних схем виділення імуноглобулінів.

Для виділення IgE людини як вихідний матеріал як правило використовують сироватку хворих на алергічні захворювання або IgE-продукувальну мієлому (проте останній варіант надзвичайно рідко через низьку розповсюдженість даного онкозахворювання). Серед основних методологічних прийомів, що застосовуються для виділення та очистки IgE, слід назвати іонообмінну хроматографію, гель-фільтрацію [2, 7] або різні варіанти імуноадсорбції [8]. Не зважаючи на велику кількість модифікацій методики, значна частина з них погано відтворюється, часто бракує достовірних способів контролю чистоти отриманого імуноглобулінового препарату. Дані різних авторів містять певні методологічні розбіжності, а інколи, й суперечності. Отримання високоочищеного препарату IgE є вкрай актуальною задачею особливо у тих випадках, коли навіть слідові кількості імуноглобулінів інших класів, що «забруднюють» препарат IgE можуть критично вплинути на процес або експеримент. З подібними труднощами дослідники стикаються, наприклад, при тестуванні гібридом-продуцентів моноклональних антитіл до IgE людини.

Описана схема отримання IgE людини заснована на використанні іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі, гель-фільтрації на сефадексі G-200 [9], яка передбачає використання як вихідного матеріалу сироватку хворих на алергічні захворювання. Недоліком даної методики є її багатоетапність та низький вихід цільового продукту.

Найбільш близьким до запропонованого способу з методологічної точки зору є спосіб виділення та очистки IgM людини [10], який передбачає: пропущення сироватки через передколонку; нанесення сироватки на імуноафінну колонку з анти-IgM МКАТ; відмивання колонки фосфатним буфером; елюція IgM хлоридом магнію; відмивання колонки фосфатним буфером; переведення IgM у фосфатний буфер на сефадексі G-25.

Задачею наших досліджень було створення високоефективної та легко відтворюваної методики виділення IgE людини, придатного для використання у високочутливих методах імуноаналізу. Поставлена задача вирішувалася шляхом: розробки схеми попереднього послідовного вилучення із сироватки імуноглобулінів G, M та A із використанням афінної та імуноафінної хроматографії; власне виділення IgE за допомогою гель-фільтрації на супердексі 200; контролю чистоти одержуваного препарату.

У порівнянні із іншими підходами запропонований нами спосіб виділення IgE людини передбачає: 1) вилучення із сироватки IgG людини за допомогою афінної хроматографії на протеїні G; 2) вилучення із сироватки IgA та IgM людини за допомогою імуноафінних сорбентів на основі анти-IgA та анти-IgM моноклональних антитіл; 3) виділення IgE людини у порівняльних експериментах із використанням супердексу 200; 4) контроль якості отриманого імуноглобуліну у імунодифузії за Оухтерлоні та електрофорезі у ПААГ у редуруючих умовах.

Запропонований спосіб дає можливість одержувати добре відтворені результати при використанні різних сироваток. Оригінальна схема має переваги в порівнянні зі схемами, заснованими на використанні іонообмінної хроматографії. Вона не вимагає значних кількостей сироватки і методика в цілому є більше простою. Ступінь чистоти одержуваного за розробленою схемою IgE не коливається від партії до партії й досягає близько 100 %, що дає можливим його використання для імунізації тварин й імуноаналізу.

Приклад 1. Теоретичне обґрунтування схеми виділення та очистки IgE людини

Під час попередніх досліджень нами було накопичено певний досвід щодо виділення та очистки імуноглобулінів інших класів, зокрема IgG (включаючи розділення на підкласи), IgA та IgM [1, 11]. У даних дослідженнях найкраще зарекомендувала себе схема із поєднанням афінної хроматографії на білках А та G й гель-фільтрації на сефакрилі S-300. Використання специфічного методу виділення IgE людини (імуноафінна хроматографія із використанням анти-IgE антитіл) у даному дослідженні було неможливим через відсутність відповідних імунохімічних реагентів.

Слід зазначити, що не було можливості оцінити доцільність та потенційну ефективність використання іонообмінної хроматографії для розділення імуноглобулінів різних класів через невизначеність щодо їх рІ. Разом із тим, зважаючи на дані різних авторів щодо близькості ізоелектричних точок різних ізотипів імуноглобулінів, а також вкрай низький вміст IgE у сироватці людини, ми вважали не доцільним включення у розроблюваному схему даного методу іонообмінної хроматографії через можливість великих втрат цільового імуноглобуліну. З іншої сторони, на нашу думку, доцільним є вилучення IgG, IgA та IgM людини із сироватки перед безпосередньо виділенням IgE. Виділення імуноглобуліну Е доцільно проводити шляхом гель-фільтрації із високою роздільною здатністю. У даному випадку перспективним сорбентом є сефакрил S-300 (використовувався в власних попередніх дослідженнях із іншими класами імуноглобулінів) та супердекс 200, який за даними [12] характеризується високою роздільною здатністю у діапазоні молекулярних мас 10^4 - 6×10^5 . Таким чином, спираючись на наявні літературні джерела [2-4] та власний досвід теоретично синтезована наступна схема виділення та очистки IgE людини: вилучення із сироватки IgG людини за допомогою афінної хроматографії на протеїні G; вилучення із сироватки IgA та IgM людини за допомогою імуноафінних сорбентів на основі анти-IgA та анти-IgM моноклональних антитіл, що були у нашому розпорядженні [11, 13]; виділення IgE людини у порівняльних експериментах із використанням сефакрилу S-300 та супердексу 200; контроль якості отриманого імуноглобуліну у імунодифузії за Оухтерлоні та електрофорезі у ПААГ у редуруючих умовах [1].

Приклад 2. Отримання вихідного матеріалу (сироватки)

Як відомо концентрація IgE у сироватці крові здорових людей становить у середньому 50 нг/мл (2,4 нг/мл відповідають 1 МО/мл). Очевидно, що такий низький рівень цільового імуноглобуліну не дозволяє використовувати таку сироватку як вихідний матеріал для виділення IgE. З літературних даних [14-16] відомо, що при низці захворювань спостерігається суттєве підвищення імуноглобуліну Е у сироватці, наприклад: при алергічному риніті - до 1000 МО/мл, при atopічній бронхіальній астмі - до 1200 МО/мл, при гельмінтозах та паразитарних інвазіях - до 2000 МО/мл, при алергічному бронхопальмонарному аспергильозі (фаза загострення) - до 8000 МО/мл, при atopічному та дифузному дерматитах - до 14000 МО/мл. Тому доцільним було використання як вихідного матеріалу сироватку пацієнтів із рівнем IgE не менше 2000 МО/мл. Методом імуноферментного аналізу (набір «IgE - ИФА -БЕСТ», виробництва Вектор-Бест, Росія) досліджуються зразки сироваток пацієнтів, які мають в анамнезі відповідні захворювання; за результатами скринінгу відбираються зразка сироватки, які використовуються як вихідний матеріал для виділення IgE.

Приклад 3. Вилучення IgG, IgM та IgA із сироватки

Для вилучення імуноглобуліну G із сироватки останню поступово наносили на афінну колонку із протеїном G, кожного разу збираючи фракцію, що не зв'язалася з колонкою; зв'язану фракцію (IgG), елюювали з колонки гліциновим буфером. Цикли вилучення проводили до повного зникнення піків після елюювання, що вказувало на повне видалення імуноглобулінів G із сироватки. На Фіг. 1 (а) представлена хроматограма першого циклу хроматографії, а на Фіг.1 (б) - останнього циклу. Для вилучення із сироватки IgM та IgA використовували імуноафінні сорбенти за наступною методикою.

На першому етапі 25 мл підготовленої сироватки пропускали через передколонку із мишачими МКАТ нейтральної специфічності (для нівелювання неспецифічної взаємодії компонентів сироватки з імуноафінним сорбентом) об'ємом 10 мл зі швидкістю 2 мл/хв. Елюат збирали й на другому етапі використали для виділення IgM та IgA людини. Дану сироватку зі швидкістю 1 мл/хв пропускали через дві послідовно з'єднані імуноафінні колонки об'ємом 10 мл з іммобілізованими анти-IgM та анти-IgA МКАТ, відповідно. Колонки ретельно відмивали 0,02 М фосфатним буфером з 0,15 М NaCl (рН 7,2-7,4) зі швидкістю 2 мл/хв. Елюцію IgM та IgA проводили з тією же швидкістю слабощелочним 1,75 М $MgCl_2 \times 6H_2O$ і реєстрували вихід імуноглобуліну при 280 нм.

Приклад 4. Виділення IgE людини та контроль його чистоти

Очистку IgE проводили на хроматографічній колонці з сефакрилом S-300 або супердексом 200, розмірами 2,5 см × 100 см, що забезпечують максимальне розділення молекул у діапазоні молекулярних мас 140-190 кДа (молекули IgG, IgA, IgD, IgE). Хроматограми, отримані із використанням згаданих вище носіїв, наведено на Фіг. 2. Профілі елюції були принципово схожими, але використання супердексу 200 забезпечувало дещо краще розділення молекул. Пік 1 мав відповідати IgE людини, пік 2 мав містити IgD людини, а пік 3 - баластні білки із меншою молекулярною масою. Припущення щодо вмісту фракцій 1-го піку було підтверджено за результатами імуноферментного аналізу (набір «IgE - ИФА - БЕСТ», виробництва Вектор-Бест, Росія). Білки фракції 1-го піку переосажували сульфатом амонію, осад розчиняли у мінімальній кількості деіонізованої води, переводили у фосфатний буфер та піддавали повторній хроматографічній очистці на супердексі 200 (Фіг. 3). На даному етапі вдалося розділити різні класи імуноглобулінів. Для аналізу фракцій 1-го піку, отриманого після другого циклу хроматографічної очистки, використовували вертикальний електрофорез у ПААГ з ДСН, результати якого наведено на Фіг. 4(1- фракція 1 піку (IgE людини); 2 - IgA людини; 3 - IgG людини; 4 -IgM людини; 5 - маркери молекулярної маси). Як видно з електрофореграми, фракції 1-го піку (трек 1) відповідає дві смуги на рівні 80 кДа та 23 кДа, які відповідають, відповідно, за важкі (H), легкі (L) ланцюги IgE. При проведенні імунодифузії за Оухтнрлоні (дані не представлено) фракція 1-го піку не давала ліній преципітації із моноспецифічними сироватки проти імуноглобуліну людини класів G, M та A. Для очистки IgE за розробленою схемою було використано 25 мл сироватки із вмістом IgE близько 9,6 мкг/мл; кількість отриманого IgE людини становила 101 мкг. Отже ефективність розробленої схеми (вихід IgE від початкової кількості у сироватці) становив 42%.

Перелік літературних джерел:

1. Nikolayenko I.V., Galkin O.Yu., Grabchenko N.I. et al. Preparation of highly purified human IgG, IgM, and IgA for immunization and immunoanalysis // *Ukrainica Bioorganica Acta*. - 2005. - Vol. 2, 2. - P. 3 - 11.
2. Иммунологические методы: Пер. с нем. / Под ред. Г.Фримеля. - М.: Медицина, 1987. - 472 с.
3. Harlow E., Lane D. Antibodies. A laboratory manual. - N.-Y.: Cold Spring Harbor, 1988. - 726 p.
4. Иммунология: Практикум / Е.У.Пастер, В.В.Овод, В.К.Позур, Н.Е.Вихоть. - К.: Высш. шк., 1989. - 304 с.
5. Шугалей И.В. Химия белка : учебное пособие / И.В.Шугалей, А.В.Гарабаджии, И.В.Целинский. - СПб.: Проспект Науки, 2010. - 200 с.
6. Hamilton R.G. The human IgG subclasses / Edited by C. Mohan. -Baltimore: Johns Hopkins University School of Medicine, 2001. - 64 p.
7. Hakimi J., Seals C., Kondas J. A. et al. The alpha subunit of the human IgE receptor (FcERI) is sufficient for high affinity IgE binding // *J. Biol. Chem.* -1991. -Vol. 265 (36). -P. 22079-22081.
8. Kleine-Tebbe J., Hamilton R.G., Roebber M. Et al. Purification of immunoglobulin E (IgE) antibodies from sera with high IgE titers // *J. Immunol. Methods*.-1995.-Vol. 179 (2). - P. 153-164.
9. Erb K.J. Helminths, allergic disorders and IgE-mediated immune responses: where do we stand? // *Eur. J. Immunol.* - 2007. - Vol. 37 (5). - P. 1170-1173.
10. Патент на корисну модель 69272 UA, МПК (2012.01) C12N 5/00. Спосіб виділення та очистки IgM людини / Галкін О.Ю., Дуган О.М.; Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут». - № у 2011 11713; Заявл. 04.10.2011; Опубл. 25.04.2012, Бюл. № 8, 2012 р.
11. Галкін О.Ю. Одержання імуноафінного сорбенту та розробка методики специфічного виділення IgM людини // *Наукові вісті НТУУ «КПІ»*. -2009.-№2.-^98-102.
12. Kagedal L., Engstrom B., Elelgren H. et al. Chemical, physical and chromatographic properties of Superdex 75 prep grade and Superdex 200 prep grade gel filtration media // *J. Chromatogr.* - 1991. - Vol. 537. - P. 17-32.
13. Галкін О.Ю., Дуган О.М. Порівняння схем імунізації мишей лінії Balb/c для одержання моноклональних антитіл до IgA людини // *Науковий вісник Національного університету біоресурсів та природокористування України*.-2009.-Вип. 134, ч. 1.-С.88-97.
14. Chowdary V.S., Vinaykumar E.C, Rao JJ. et al. A study on serum IgE and eosinophils in respiratory allergy patients // *Indian J. Allergy Asthma Immunol.* - 2003. - Vol. 17(1). - P. 21-24.
15. Platts-Mills T.A.E. The role of immunoglobulin E in allergy and asthma // *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* - 2001. - Vol.164. - P. S1-S5.
16. Novak N., Bieber T. Allergic and non-allergic forms of atopic disease // *J. allergy. Clin. Immunol.* - 2003. - Vol. 112. - P. 252-262.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб виділення IgE людини, що дає можливість одержувати препарати IgE високого ступеня чистоти, який **відрізняється** тим, що передбачає вилучення із сироватки IgG людини за допомогою афінної хроматографії на протеїні G, вилучення із сироватки IgA та IgM людини за допомогою імуноафінних сорбентів на основі анти-IgA та анти-IgM моноклональних антитіл, виділення IgE людини двоетапною гелі-фільтрацією на супердексі 200, контроль якості отриманого імуноглобуліну у імунодифузії за Оухтерлоні та електрофорезі у поліакриламідному гелі у редуруючих умовах.

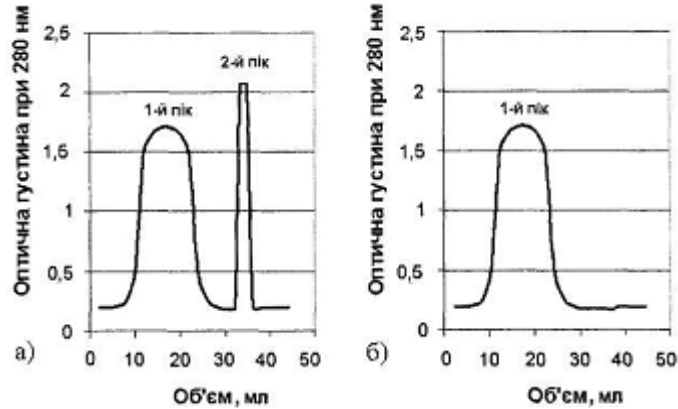


Fig. 1

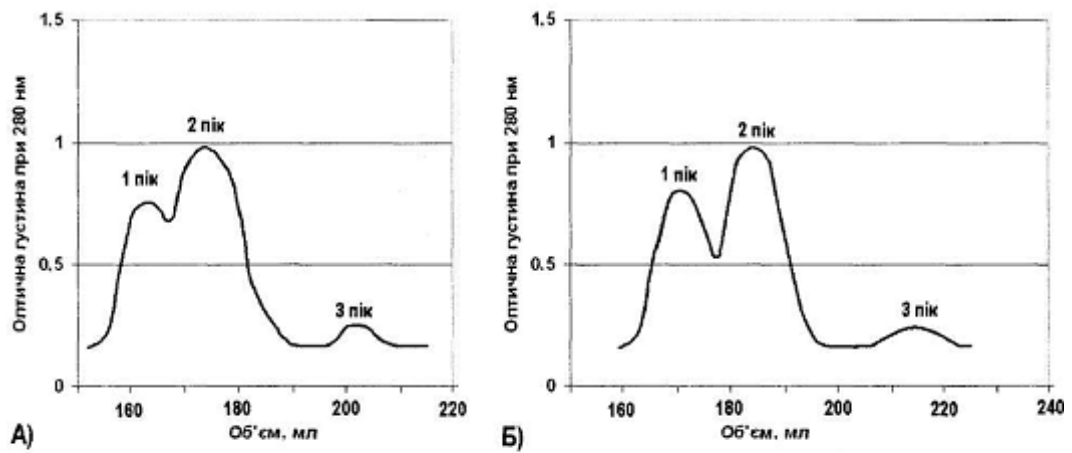


Fig. 2

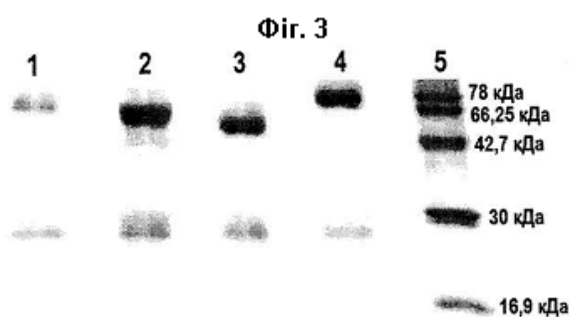
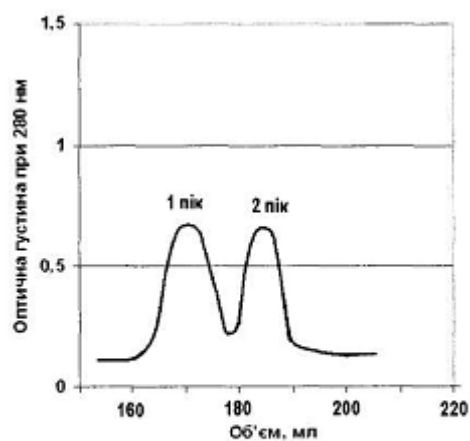


Fig. 4

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601