



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К ПАТЕНТУ

- (21) 3817568/28-14
(22) 23.11.84
(31) Р 3342870.0
(32) 26.11.83
(33) DE
(46) 30.01.89. Бюл. № 4
(71) Бёрингер Маннхайм ГМБХ (DE)
(72) Ханс-Георг Бац, Херберт Юнгфер, Хельмут Ленц и Альберт Бёдер (DE)
(53) 615.373(088.8)
(56) Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1971, v. 68, p. 2401-2406.
(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ДИГИТАЛИС-АНТИТЕЛ
(57) Изобретение относится к области иммунохимии и относится к способу получения дигиталис-антител. Целью изобретения является повышение специфичности антител и степени очист-

ки от эндотоксинов. Способ осуществляется получением специфической антисыворотки, выделением гамма-глобулина, иммуносорбций на иммуносорбенте, представляющем пористое стекло, или силикагель или окись алюминия с объемом пор 1-20 м²/г, в котором через этоксилилпропиламин связан дигитоксинальдегид, и расщеплением папаина на иммуносорбенте. При этом дигиталис-антитела элюируют с иммуносорбента водной кислотой после предварительного промывания раствором с рН 6,0-7,5. Полученные антитела дополнительно очищают гель-хроматографией на сефакриле-200 и ионообменной хроматографией на ДЕАЕ-целлюлозе ДЕ-32. Специфичность полученных антител повышается на 18-20%.

1
Изобретение относится к медицине, а именно к иммунохимии и касается способа получения дигиталис-антител.

Целью изобретения является повышение специфичности антител и степени очистки от эндотоксинов.

Пример 1. Получение овечьей антидигитоксинальной сыворотки.

Иммуноген.

Дигоксин-глутарил-о-оксисукцинимид в водном растворе вводится во взаимодействие с протеином, особенно с бычьим глобулином или эдестином (протеином из семян конопли). После отделения избытка производного дигоксина несколько молекул дигоксина на молекулу протеина с концевой ди-

2
гитоксозой через глутарильную цепь связываются с протеином.

Иммунизация.

0,5 мг дигоксин-иммуногена в полном аднованте Фрейнда вводятся внутривенно здоровым овцам весом не менее 45 кг. Сначала через каждые 2 недели и затем через каждые 4 недели иммуноген в таком же носителе снова вводится внутримышечно и подкожно для повышения иммунного ответа. Спустя 2-4 мес достигается титр в сыворотке животных 1 мг дигоксин-специфического иммуноглобулина/мл.

Отбор сыворотки, аналитика, образование пула.

У здоровых животных, которые достигли при отборе пробы указанного титра, минимально в течение года ежедневно можно отбирать кровь из шейной вены. В выборочных пробах отбора постоянно контролируется титр с помощью радиоиммунного теста или с помощью ферментиммунного теста. Константы связывания также определяются в выборочных пробах путем оценки связывания радиоактивно маркированного дигтоксина путем определенных разбавлений антисывороточных проб. В соответствии с литературой получаются величины 5×10^9 – 5×10^{10} л/моль. Для того чтобы поддерживать по возможности незначительными колебания в составе используемой для выделения ФАБ-фрагментов антисыворотки, собираются количества 20–50 л из отдельных отборов нескольких овец.

2. Приготовление иммуносорбента.

Содержащее амино-группы стекло.

Для удаления мелких частиц и примесей 940 г пористого стекла с поверхностью $10 \text{ м}^2/\text{г}$ обрабатывают в водной суспензии ультразвуком, затем нагревают в течение 3 ч в среде 65%-ной азотной кислоты при 80 – 90°C . После вымывания кислоты стекло высушивают при 150°C . Очищенное стекло медленно с обратным холодильником перемешивается в 2,7 г безводного диметилсульфоксида с 300 мл 3-(триэтоксисилил)пропиламина в течение 20 ч при 85°C . Избыточный силиламин вымывается изопропанолом и аминированное стекло снова высушивается (60°C , небольшой вакуум). Выход примерно 1,8 г аминопропильного стекла (750 г).

Окисление дигитоксина.

6 г дигитоксина в 450 мл смеси этанола с водой (2:1) подвергают взаимодействию со стехиометрически равным количеством перистата натрия (1,7 г) в течение 20 ч при комнатной температуре. Нерастворимый осадок отфильтровывают и удаляют. Надосадочную жидкость упаривают досуха на ротационном испарителе. Остаток промывается 2×100 мл воды, затем высушивается в вакууме над хлоридом кальция. Выход 4–5 г окисленного дигитоксина.

Адсорбент дигитоксин-стекло.

4,5 г окисленного дигитоксина растворяют в 2,25 л смеси этанола

с водой (2:1), смешивают с 750 г аминопропильного стекла и медленно перемешивают в течение 20 ч при комнатной температуре. Стекло отфильтровывают. Дигитоксин определяют путем измерения экстинкции в УФ-области (260 нм) и по полученным данным вычисляют количество фиксированного дигитоксина (заданное значение: 3 мг дигитоксина на мл объема стекла). 4 г боргидрата натрия растворяют в 1 л бидистиллированной воды, разбавляют 2 л этанола и подают на модифицированное дигитоксином стекло. При многократных встряхиваниях в течение 2 ч при комнатной температуре устанавливают pH 7,0–7,4 путем добавления 2 мМ соляной кислоты. При этом сначала фиксированному на стекле через лабильные связи типа шиффового основания дигитоксину сообщается прочная степень фиксации. Полученный иммуносорбент тщательно промывают этанолом, водой, этанолом, затем высушивают в слабом вакууме. Выход 1,8 г иммуносорбента.

Подготовка иммуносорбента для непосредственного употребления.

Сорбент суспендируют в буфере А (50 ммоль фосфата с pH=7,0/0,15 М хлористого натрия/0,1% азиды натрия), подают в стеклянную колонку с фриттой и последовательно промывают раствором 0,5 М хлористого натрия и 0,05%-ного твина-20, бидистиллированной водой и 1 М пропионовой кислотой, наконец, уравнивается буфером А. Использованный иммуносорбент регенерируют путем промывки 1 М пропионовой кислотой, после чего хранят в буфере А при 4°C . Сорбент можно использовать многократно. Непосредственно перед употреблением свежий сорбент предварительно промывают.

3. Получение овечьего антидигитоксин-ФАБ-фрагментов.

Используемые растворы стерилизуют в автоклавах или путем мембранной фильтрации. Используемая для приготовления растворов вода пирогеносвободна за счет дистилляции. Емкости, приборы, а также другие вспомогательные материалы (например материалы для хроматографии) становятся пирогенно-свободными за счет нагревания или же путем обработки 0,5 М гидроксида натрия.

800 мл концентрируют путем ультра-
фльтрации до объема 150 мл, затем
диализуют по отношению к буферу
(15 Мм фосфата, pH 7,5/0,15 М хлорис-
того натрия).

Хроматографию повторяют для второй
части ФАБ-лиофилизата на той же ко-
лонке. Обе хроматографированные час-
ти снова объединяют для дальнейшего
использования. Промежуточное хране-
ние первой части осуществляют при
-20°C.

Пропускание через ионообменник
(4°C).

400 мл целлюлозы марки DE-52 (пред-
варительно обработанной 0,5 н HCl
и 0,5 н. NaOH для стерилизации и
освобождения от пирогена) подают в
колонку и уравнивают 10 ммоль
фосфатного буфера с pH-7,1. ФАБ-про-
теин с предыдущей стадии путем ульт-
рафльтрации доводят до концентрации
50 мг/мл и затем пропускают через
колонку. ФАБ-протеин вытекает почти
немедленно, следы посторонних
протеинов (например альбумина, ФС-
фрагменты и т.д.) удерживаются. ФАБ-
протеин в стоке собирают, в случае
необходимости концентрируют путем
ультрафльтрации до 15-20 мг проте-
ина/мл, на электроде значение pH
доводят до 7,0-7,1 и стерильно филь-
труют через мембранный фильтр с вели-
чиной 0,2 мкм. Конечный выход 5-6 г
овечьего антидифтерийного ФАБ. От-
фильтрованный стерильно целевой про-
дукт заливают в стеклянные емкости
при отсутствии микроорганизмов и
хранят при -20°C.

Дигиталис-антитела, получаемые
в примере 1, содержат 84,8 мг бел-
ков в ампуле и имеют связывающую ем-
кость, равную 0,013 мг дигоксина/мг
ФАБ-фрагментов. Кроме того, содержа-
ние эндотоксина (белковой примеси,
которая может вызвать лихорадку и
аллергические эффекты) в ампуле со-
ставляет 0,22 единицы. Дигиталис-
антитела, получаемые известным спосо-
бом, имеют следующие качества: содер-
жание белков 43,8 мг; связывающая
емкость 0,011 мг дигоксина/мг ФАБ-
фрагментов; содержание эндотоксина
в ампуле 12,8.

Сравнение данных по связывающей
емкости, являющейся мерой специфич-
ности дигиталис-антител, свидетель-
ствует о том, что получаемые предла-

гаемым способом антитела имеют специ-
фичность, которая на 18,2% превышает
специфичность антител, получаемых
известным способом.

Кроме того, получаемые предлага-
емым способом антитела также имеют
более высокую степень чистоты, о чем
свидетельствует сравнение данных по
содержанию эндотоксина (см. таблицу).

Пример 2. Повторяют при-
мер 1, с той лишь разницей, что в
разделе 2 используют силикагель
с поверхностью 20 м²/г. При этом
очистку исходного силикагеля осущест-
вляют путем трехкратного суспендиро-
вания в 2 л слабо подкисленной азот-
ной кислотой воды с последующим де-
кантированием мелких компонентов на
каждой стадии. Получаемые дигиталис-
антитела имеют то же качество, что
и антитела примера 1.

Пример 3. Повторяют пример 1,
с той лишь разницей, что в разделе 2
используют гель окиси алюминия с по-
верхностью 1 м²/г. При этом очистку
исходного силикагеля осуществляют
путем трехкратного суспендирования
в 2 л слабо подкисленной азотной кис-
лотой воды с последующим декантиро-
ванием мелких компонентов на каждой
стадии. Кроме того, иммуносорбент
используют в разделе 3 в количестве
5,0 л. Получаемые дигиталис-антитела
имеют те же качества, что и антитела
примера 1.

Пример 4. Повторяют пример
1 с той лишь разницей, что стадию
элюции ФАБ-фрагментов осуществляют:
а) 3 ммоль водной фосфорной кислоты
или б) 5 ммоль водной уксусной кис-
лоты, или в) 2 ммоль водной серной
кислоты.

Получаемые при этом дигиталис-
антитела имеют те же качества, что
и антитела примера 1.

Пример 5. Повторяют при-
мер 1, однако в качестве раствори-
теля для адсорбции и расщепления
папаином применяют лишь буферный
раствор ацетата натрия и уксусной
кислоты (0,5 М, pH 6,0). Расщепление
папаином проводят тем, что раствор
240 мг папаина в 2 л этого буфера
подают прямо на колонку, при этом
жидкость пропускают приблизительно
за 30 мин и непосредственно после
этого пропускание прекращают и раст-
вор еще 5 ч загружают колонку. Непо-

Предварительная очистка овечьей антидигоксиновой сыворотки.

30 л антисыворотки перемешивают в течение 1 ч при комнатной температуре вместе с 300 г аэрозоля для удаления липопротеинов. После отделения аэрозоля путем центрифугирования из охлажденной до 4°C надосадочной жидкости путем добавки твердого сульфата аммония до концентрации 1,8 М осаждают гамма-глобулины. Путем центрифугирования собирают осадок, растворяют в растворе 0,15 М хлорида натрия (0,1% азида) и диализуют по отношению к буферу (15 мМ фосфата, pH 7,1/50 мМ хлористого натрия/0,002% гибитана) при 4°C. Диализат подают на 16,2 л колонки с диэтиламиноцеллюлозой (DE-52) и элюируют буфером того же состава, что и буфер для диализа. Выходящий из колонки вместе с этим буфером протеин представляет собой служащую для выделения ФАБ-фрагментов иммуноглобулиновую фракцию из овечьей антидигоксиновой сыворотки. Выход протеина составляет 500–700 г. Содержание дигоксин-специфических антигенов примерно 80–90% исходного титра в сыворотке.

Специфическая адсорбция.

250 г иммуноглобулиновой фракции в 10 л раствора с содержанием дигоксин-специфического иммуноглобулина, равным 15 г, подают в буфер 50 ммоль фосфата/0,15 М хлористого натрия/0,002% гибитана (pH 7,0, буфер Б). Этот раствор при комнатной температуре в течение примерно 2 ч прокачивают через колонку, заполненную 2,4 л указанного имунсорбента. Специфические иммуноглобулиновые фрагменты связываются на 90% с адсорбентом. Адсорбент промывают буфером Б, к которому добавляют еще 0,35 М хлористого натрия и 0,05%-ного трина-20, затем уравнивают буфером В (85 ммоль фосфата, pH 7,0/0,15 моль хлористого натрия/ 2 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты/10 мМ цистеина/0,01% гибитана), который пригоден для последующего расщепления папаином.

Ферментативная фрагментация.

Нагруженный специфическим к дигоксину иммуноглобулином адсорбент сразу переводят в стеклянные емкости и смешивают с 240 мг папаина,

растворенного в 2 л буфера С. При медленном перемешивании с помощью лопастной металлической мешалки инкубируют в течение 255 мин при 37°C.

Путем измерения проб надосадочной жидкости суспензии-адсорбента в УФ-фотометре (280 нм) в различные моменты во время инкубации можно проследить за кинетикой выделения протеина ФС и таким образом образования ФАБ-фрагментов. По окончании инкубации адсорбент снова загружают в колонку и промывают буфером Б. Для насыщения свободными Н-группами из процесса расщепления папаином в присутствии цистеина адсорбент промывают буфером (75 мМ фосфата, pH = 7,5/0,15 М хлористого натрия/0,01% гибитана), к которому добавляют 10 мМ иодацетамида. Иодацетамидный буфер оставляют на 2 ч при комнатной температуре в контакте с адсорбентом. Затем с помощью раствора 0,15 моль хлористого натрия/0,01% гибитана вымывают избыточный иодацетамид и с помощью 30 мМ раствора хлористого натрия подготавливают адсорбент для осуществления элюации.

Элюация (при комнатной температуре).

Для элюирования специфических ФАБ-фрагментов через колонку пропускают 3 мМ водной соляной кислоты. ФАБ-протеин в стоке из колонны обнаруживают путем измерения УФ-адсорбции (280 нм) и собирают. 5–7 л раствора, содержащего примерно 11 г протеина, концентрируют путем ультрафильтрации до объема 200–250 мл, затем тотчас лиофилизируют.

Гель-проникающая хроматография (4°C).

Колонку длиной 1 м заполняют 7,5 л сефакрила S-200 и уравнивают буфером (5 мМ фосфата, pH=7,0/0,5 М хлористого натрия/0,002% гибитана). Примерно 5 г ФАБ-лиофилизата растворяют в 110 м уравнивающего буфера и подают на колонку. Путем регистрации УФ-абсорбции в элюате устанавливают ФАБ-пик с молекулярным весом 50000 и его собирают. Выход примерно 3,75 г гель-хроматографически однородного протеина. Остальные иммуноглобулиновые фракции, высокомолекулярные ФАБ-агрегаты и фракции с меньшим молекулярным весом отделены. ФАБ-раствор объемом примерно 700–

средственно после этого промывают 4 л свободного от папаина буферного раствора и ФАБ-фрагменты вымывают 5 ммоль водной уксусной кислоты согласно примеру 4. Результаты соответствуют результатам примера 1.

П р и м е р 6. Реакцию примера 1 повторяют с той лишь разницей, что хлористый натрий, добавляемый к буферному раствору С, заменяют 0,2 моль карбоната алюминия. Кроме того, гель-ферментативную хроматографию на сефакиле S-200 заменяют хроматографией на сефадексе 1 25 М (Pharmacia Fine Chemicals). В этом случае результаты также соответствуют результатам примера 1, доказывая, что не адсорбционное средство, а тип расщепления антител оказывает соответствующий эффект. При этом нет также различий, если расщепление проводят не в отдельном сосуде, а непосредственно в колонке.

П р и м е р 7. Повторяют пример 5, 25 причем используют натрийфосфатный буфер (0,5 М, pH=7,5) в качестве растворителя для адсорбции и расщепления папаина и в качестве адсорбирующего средства применяют силикагель с удельной поверхностью 1,0 м²/г.

Расщепление папаина осуществляют тем, что раствор 240 г папаина в 2 л этого буфера наносят прямо на колонку, причем жидкость течет примерно 30 мин и после этого прерывают ее течение и раствор еще следующие 5 ч оставляют на колонке. Затем промывают с помощью 4 л не содержащего папаина буфера и ФАБ-фрагменты вымывают с помощью 5 ммоль водной уксусной кислоты согласно примеру 4б. Результаты соответствуют примеру 1.

П р и м е р 8. Реакцию примера 1 повторяют с тем отклонением, что гель-ферментационную хроматографию осуществляют на геле оксида алюминия с удельной поверхностью 20 м²/г. В растворе фосфатного буфера устанавливают pH=7,0. Также при этом получают результаты, соответствующие примеру 1.

Предлагаемый способ позволяет повысить на 18-20% специфичность

антител и значительно повысить степень удаления эндотоксина.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ получения дигиталис-антител, включающий иммунизацию млекопитающих дигоксинбелковым антигеном, выделение гамма-глобулина, расщепление папаином, выделение ФАБ-фрагментов на иммуносорбенте с использованием промывки и элюации, гель-фильтрации и ионнообменной хроматографии, отличающийся тем, что, с целью повышения специфичности антител и степени очистки от эндотоксинов, что антитела адсорбируют на иммуносорбенте, состоящем из пористого стекла, или силикагеле, или окиси алюминия с объемом пор 1-20 м²/г, в котором через этоксилилпропиламин связан дигитоксинальдегид, антитела расщепляют на адсорбенте, промывку осуществляют буферным раствором с pH 6,0-7,5 и антитела элюируют водной кислотой.

Пример №	Способность к связыванию, мг (дигоксина/мг ФАБ-фрагмента)	Эндотоксины, ед.
Сравнение	0,011	12,8
30 1	0,013	0,22
2	0,013	0,28
3	0,012	0,87
40 4а	0,013	0,30
4б	0,014	0,1
45 4в	0,013	0,50
5 5	0,13	0,75
6	0,12	0,44
50 7	0,14	0,70
8	0,15	0,26