



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

262555

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

A 61 K 39/395

(22) Přihlášeno 19 05 87

(21) PV 3625-87.M

(40) Zveřejněno 15 06 88

(45) Vydáno 14 07 89

(75)

Autor vynálezu

POKORNÝ MILOŠ prom. chem. CSc., ULRYCH STANISLAV RNDr.,
BENEŠ MILAN ing. CSc., ODEHNALOVÁ NADĚŽDA, PRAHA

(54) Způsob izolace imunoglobulinu afinitní chromatografií

Řešení se týká způsobu izolace plazmatického imunoglobulinu afinitní chromatografií na substituovaných porézních sférických celulózech s imobilizovaným ligandem histidinu, lysinu, reaktivní žlutí 13 (C.I. 18 990) nebo 2-(4-amino-fenyl)sulfonylethylskupinami a produkty jejich diazotace a samovolné přeměny. Princip postupu, který je založen na nespecifické imunoafinitě vyznačených funkčních skupin k imunoglobulinu, je založen na jeho sorpci, oddělení nezachycených bílkovin a následné desorpci koncentrovaným roztokem solí, s výhodou 3,5M chloridu hořečnatého nebo vápenatého. Pro zvýšení účinku se doporučuje přidání 1,4-dioxanu, případně stabilizující složky, jako je octan sodný, glukóza nebo maltóza. Získaný eluát se zbaví nadbytečného množství solí dialýzou nebo diafiltrací. Uvedeným způsobem je možné připravit plně nativní elektroforeticky čistou imunoglobulinovou frakci třídy IgG.

Vynález se týká izolace imunoglobulinu třídy IgG metodou afinitní chromatografie z roztoků obsahujících uvedenou imunoglobulinovou frakci ve směsi bílkovin, jako je krevní plazma, sérum nebo roztoky vzniklé jejich frakcionací.

Způsobů, vhodných pro izolaci imunoglobulinové frakce z krevní plazmy nebo séra, je známa celá řada. Tyto postupy jsou podrobně popsány v přehledných monografiích (H. E. Schultze, J. F. Heremans: *Molecular biology of human proteins*, Elsevier, Amsterdam 1966), (F. W. Putnam: *The plasma proteins*, vol III, Acad Press, New York (1977), (P. Allen, E. A. Hill, A. M. Stokes: *Plasma proteins*, Blackwell Sci. Publ., Oxford 1977). Pro izolaci imunoglobulinu z lidské krevní plazmy ve výrobním měřítku je nejčastěji využívána metoda etanolové frakcionace za chladu (Cohn a spolupracovníci: *J. Amer. Chem. Soc.* 72, 465 (1950)). Všechny tyto postupy, které lze označit za klasické, mají poměrně nízký rozdělovací účinek a proto je třeba způsoby dělení vhodně kombinovat nebo opakovat, aby bylo dosaženo požadované čistoty konečného produktu. Jako vysoce účinná a výhodná z hlediska selektivity z pohledu zachování terciární struktury izolovaných bílkovin a jednoduchosti provedení se osvědčuje metoda afinitní chromatografie. Metoda je založena na principu interakce vazebného ligandu imobilizovaného na pevném nosiči s příslušným místem na molekule izolovaného proteinu. Postup se například velmi osvědčuje při izolaci enzymů. O této poměrně nové metodě pojednává řada obsáhlých publikací (Ch. R. Lowe, P. D. G. Dean: *Affinity Chromatography*, ed. J. Wiley Ltd. London 1974), (J. Turková: *Affinity Chromatography*, Elsevier Sci. Publ. Co. Amsterdam 1978), (S. P. Colovick, N. O. Kaplan, W. B. Jakoby: *Methods in enzymology-Affinity Chromatography* vol. 104, Part. C, Acad. Press INC 1984). Specifitou uvedených metod je skutečnost, že každý příklad dělení vyžaduje vlastní specifickou volbu optimálních podmínek počínaje výběrem vhodného nosiče a příslušného vazebného ligandu a konče podmínkami sorpce a desorpce dělené látky. Zvláštní skupinou vazebných ligandů jsou imobilizovaná barviva (P. D. G. Dean, F. Qadri: *Affinity Chromatography on immobilized dyes, Solid Phase Biochemistry*, ed. W. H. Scouten, J. Wiley 1983). Typickým příkladem jejich využití je izolace sérového albuminu na sorbentu s imobilizovanou reaktivní modří (Procion Blue H-B) (J. Saint-Blacard, J. M. Kirzin, P. Riberran, F. Petit: *Affinity Chromatography and Related Techniques*, ed. Elsevier 1985 str. 305), (K. Pommerening, D. Jobsky, M. Beneš, J. Štamberg: AO č. 237 620), (M. Pokorný, M. Beneš, M. Holinka, K. Pommerening, S. Ulrych: Čs. AO 257 930). Jiným příkladem je užití reaktivní žlutí HAC1 imobilizované na Sepharosu k izolaci imunoglobulinu (P. G. H. Byfield: *Mol. Immunol.* 21(7), 647 (1984)), (G. Birkenmeier: *FEBS Letters* 174(1), 162 (1984)). Jiným příkladem kovalentně vázaného afinitního ligandu jsou některé aminokyseliny. Například k izolaci plazminogénu bylo užito Arginin-Sepharosy 4B (M. Wu, G. K. Azimura, A. A. Yunis: *Biochemistry* 16, 1 908 (1977) nebo Lysin-Sepharosy 4B (D. G. Deutsch: *Science* 170, 1 095 (1970)). O možnostech využití sorbentu s vázaným histidinem na matici Sepharosy nebo porézního skla bylo hovořeno na mezinárodním Symposiu o bioafinitní chromatografii v Praze (L. Amourache, S. Kanoun, S. Krishnan, M. A. Vijayalakshni: *Abstracts of 6th International Symposium on Bioaffinity Chromatography*, September 1985 Praha str. 149). Zvláštním případem jsou postupy založené na principu imunoafinitní chromatografie. Jako příklad může sloužit izolace imunoglobulinu se specificky zvýšeným obsahem antitetanických nebo antistafylokokových protilátek. (M. Pokorný, S. Ulrych, M. Beneš, M. Kyselová, N. Odehnalová, J. Řenčová: AO č. 256 654).

Pro praktické využití jakéhokoli postupu afinitní chromatografie je třeba zvolit optimální podmínky v celém procesu dělení. Je to především volba vhodného pevného nosiče, vazebného ligandu, postupu při sorpci žádané látky, eluční médium a řada dalších podmínek, které umožní získání nativního, plně účinného produktu v požadované čistotě a při dostatečné výtěžnosti. teprve při souhrě všech faktorů se v plné míře uplatní přednosti postupu afinitní chromatografie. Metody afinitní chromatografie lze využít i při izolaci imunoglobulinu ze směsi dalších bílkovin.

Totoho principu využívá způsob izolace imunoglobulinu třídy IgG z krevní plazmy, séra nebo roztoků obsahujících kromě imunoglobulinové frakce směs dalších bílkovin metodou afinitní chromatografie vyznačující se tím, že porézní sférická celulóza obsahující kovalentně imobilizovaný histidin, lysin, reaktivní žluť 13 GGL nebo 2-(4-aminofenyl)sulfonyletyl skupiny nebo produkty jejich diazotace a samovolné přeměny se uvede do styku s roztokem směsi bílko-

vin, nejlépe za chladu $+4^{\circ}\text{C}$, načež se oddělí roztok obsahující nezachycený podíl bílkovin, sorbent se promyje dostatečným množstvím roztoku o nízké iontové síle, která odpovídá koncentraci 0,1 až 0,01M roztoku chloridu sodného nebo 0,05M borátového pufru pH 8,0 až 8,5 a zachycený imunoglobulin se desorbuje pomocí 3,0 až 3,5M roztoku chloridu hořečnatého nebo vápenatého, který může dále obsahovat 0,1 až 0,2M octan sodný, 1 až 5 % maltózy nebo glukózy a 1 až 5 % 1,4-dioxanu, načež se takto získaný eluát obsahující imunoglobulin zbaví solí dialýzou nebo diafiltrací.

Uvedený způsob izolace imunoglobulinu je založen na principu nespecifické imunoafinity. Při porovnávání s ostatními frakcionačními postupy má přednosti, kterými se vyznačuje metoda afinitní chromatografie, to jest vysoká selektivita, spolehlivost, jednoduchost v provedení, energetická nenáročnost, nízká pracnost, maximální snížení rizika při práci s infekčním materiálem a možnost automatizace celého procesu. Podmínkou však zůstává dodržení postupu při provedení.

Využití sférické celulózy jako nosiče k imobilizaci histidinu, lysinu, reaktivní žlutí 13 GGL a 2-(4-aminofenyl)sulfonyletyl skupiny má výhodu oproti jiným podobným sorbentům v dob-
rých průtokových vlastnostech, stabilitě, nepatrné změně objemu při kolísání pH a iontové síly, v neškodnosti pro případ jejich využití pro přípravu léčebných preparátů a v jejich dostupnosti. Navrženým postupem lze získat imunoglobulinovou frakci o vysoké elektroforetické čistotě, která odpovídá třídě IgG. Lidský imunoglobulin připravený tímto způsobem je plně nativní bez agregovaných podílů a projevuje nízkou antikomplementární aktivitu. Sorbent je možné opakovaně regenerovat.

P ř í k l a d 1

Sloupcem 12x1 cm sférické celulózy s imobilizovaným histidinem ($30\text{ }\mu\text{mol/g}$) v prostředí 0,05M borátového pufru se nechá protékat rychlostí 10 ml za hodinu 11 ml lidské krevní plazmy při teplotě 4°C . Sloupec se promyje 30 ml 0,2M roztokem chloridu sodného rychlostí 40 ml za hodinu, čímž se oddělí nezachycený podíl bílkovin. Desorpce se provede 30 ml 3,5M roztokem chloridu hořečnatého v 0,2M octanu sodném, do něhož bylo přidáno 5 % 1,4-dioxanu a 1 % glukózy. Eluce se dokončí promytím destilovanou vodou. Regenerace sorbentu se provede promýváním 0,05M louhem sodným v 1M chloridu sodném, destilovanou vodou a stabilizací v 0,05M borátovém pufru pH 8,5. Eluát obsahující imunoglobulin se dialyzuje proti 0,2% chloridu sodnému, pokud roztok obsahuje hořečnaté ionty a dále se zahustí ultrafiltrací na požadovanou koncentraci bílkoviny. Takto bylo získáno 775 g bílkoviny, která odpovídala elektroforeticky 98,8 % imunoglobulinu třídy G (IgG).

P ř í k l a d 2

K 10 ml sférické celulózy s imobilizovaným lysinovým ligandem ($30\text{ }\mu\text{mol/g}$) se přidá 30 ml 2% roztoku bílkovin, který vznikl při rozpuštění sraženiny frakce II-III etanolového frakcionačního postupu dle Cohna. Suspenze se míchá za chladu dvě hodiny. Poté se oddělí tekutina na skleněné fritě a sorbent se promyje roztokem 0,2M octanu sodného tak, aby byla oddělena nezachycená část bílkovin. Sorbent se převede do chromatografické kolony a navázaná bílkovina se desorbuje 3,5M roztokem chloridu vápenatého. Získaný eluát se dialyzuje tak dlouho, až neobsahuje vápenaté ionty. Nakonec se roztok usuší lyofilizací. Takto bylo získáno 45 mg bílkoviny, která odpovídala elektroforeticky 96 % IgG.

P ř í k l a d 3

Sloupcem 40x1,5 cm sférické celulózy s navázanou reaktivní žlutí 13 GGL (C. I. 18 990) se nechá zvolna protékat při 20°C 50 ml filtrovaného séra. Sloupec se promyje 0,05M borátovým pufrům pH 8,5. Prvý podíl bílkoviny se uvolní elucí pufrovaným fyziologickým roztokem pH 7,2. Zachycený imunoglobulin se desorbuje pomocí 40% roztoku chloridu hořečnatého. Eluce se dokončí promýváním vodou. Získaný roztok obsahující imunoglobulinovou frakci se diafiltra-

cí zbaví nadbytečného množství solí a usuší se lyofilizací. Takto bylo získáno 575 mg bílkoviny, která odpovídala elektroforeticky 91 % IgG.

P ř í k l a d 4

Na sloupec 7,5x1 cm celulózy s imobilizovanými 2-(4-aminofenyl) sulfonylethyl skupinami a produkty jejich diazotace a samovolné přeměny se aplikuje 10 ml krevní plazmy. Další postup dělení je stejný, jako je uvedeno v příkladech 1, 3, 4 nebo 5. Takto bylo získáno 40 mg bílkoviny, která odpovídala elektroforeticky 95 % IgG.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob izolace imunoglobulinu třídy IgG z krevní plazmy, séra nebo z roztoků obsahujících kromě imunoglobulinové frakce směs dalších bílkovin metodou afinitní chromatografie vyznačující se tím, že porézní sférická celulóza obsahující kovalentně imobilizovaný histidin, lysin, reaktivní žluť 13 GGL nebo 2-(4-aminofenyl)sulfonylethyl skupiny nebo produkty jejich diazotace a samovolné přeměny se uvede do styku s roztokem směsi bílkovin s výhodou při teplotě +4 °C, načež se oddělí roztok obsahující nezachycený podíl bílkovin, sorbent se promyje roztokem o nízké iontové síle, která odpovídá koncentraci 0,1 až 0,01M roztoku chloridu sodného nebo 0,05M borátového pufu pH 8,0 až 8,5 a zachycený imunoglobulin se desorbuje pomocí 3,0 až 3,5M roztoku chloridu hořečnatého nebo vápenatého, který může dále obsahovat 0,1 až 0,2M octan sodný, 1 až 5 % maltózy nebo glukózy a 1 až 5 % 1,4-dioxanu, načež se takto získaný eluát obsahující imunoglobulin zbaví solí dialýzou nebo diafiltrací.