

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

O P I S P A T E N T O W Y P A T E N T U T Y M C Z A S O W E G O

73223

Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 15.11.1971 (P.151567)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 30.05.1973

Opis patentowy opublikowano: 31.01.1975

Kl. 30h, 2/04

MKP A61k 23/02

Twórcy wynalazku: Eugenia Nowicka, Robert Krauze, Jerzy Mikoszewski

Uprawniony z patentu tymczasowego: Wytwórnia Surowic i Szczepionek, Warszawa (Polska)

Sposób rozdzielania surowiczych immunoglobulin klasy A od immunoglobulin klasy M

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób rozdzielania immunoglobulin surowiczych klasy A od immunoglobulin klasy M.

Immunoglobuliny klasy A i M stanowią część grupy białek surowic ludzkich i zwierzęcych zwanych gamma-globulinami. Gamma-globuliny spełniają funkcję przeciwciał i odgrywają ważną rolę w mechanizmie odpornościowym organizmu. Oddzielone od pozostałych białek surowicy ludzkiej lub zwierzęcej stanowią cenny lek stosowany w terapii i profilaktyce.

Wobec częstego występowania patologicznych niedoborów odpornościowych, polegających na braku w surowicach immunoglobulin A lub M i powodujących objawy chorobowe, stosuje się terapię przy pomocy podawania oczyszczonej immunoglobuliny brakującej klasy. Oczyszczone immunoglobuliny klasy A i M znajdują również zastosowanie jako ważne odczynniki do badań biochemicznych oraz jako materiał wyjściowy do otrzymywania immunosurowic przeciw IgA i przeciw IgM, używanych w diagnostyce klinicznej do wykrywania stanów patologicznych.

Izolowanie z surowicy czystych immunoglobulin A lub czystych immunoglobulin M, zwłaszcza na większą skalę, stanowi ciągle trudny problem techniczny ze względu na wieloetapowość procesów i ich małą końcową wydajność. Jedną z trudności, napotykaną przy oczyszczaniu immunoglobulin A i M, jest oddzielanie ich od siebie w taki

2

sposób, aby każdy z rozdzielanych składników mógł być użyty do dalszego procesu w niezmiennym stanie fizykochemicznym. Rozdziału obu tych białek dokonywano chromatograficznie, adsorbując je na DEAE-celulozie i eluując następnie buforem fosforanowym o pH = 8 w gradiencie stężeń od 0,02 do 0,3 M (Fahey, 1962).

Otrzymywane wyniki były jednak niezadowalające, ponieważ znaczna część materiału pozostawała nierozdzielona. Inne metody rozdziału, oparte na różnicy w ciężarze cząsteczkowym obu immunoglobulin, polegały na sączeniu białek przez sito molekularne Sephadex G-200 (Flodin, Killander, 1962) lub ultrawiroowaniu (Reisner, Franklin, 1961). Obie te metody nadają się raczej do stosowania na małą skalę laboratoryjną.

Celem wynalazku jest zastosowanie takich warunków rozdziału chromatograficznego białek, zawierających gamma-globuliny surowicze, aby immunoglobuliny A i M znajdowały się w stanie niezdenaturowanym w dwóch dobrze oddzielonych od siebie frakcjach i aby stanowiły dogodny półprodukt do ich dalszego otrzymywania w stanie czystym.

Sposobem według wynalazku, wykorzystuje się występującą przy pH powyżej 6,0 różnicę w powinowactwach pomiędzy immunoglobuliną A, jonami wersenianowymi i immunoglobuliną M względem kationowych wymienników jonowych, zawierających jako grupy czynne aminy II, III i IV rzę-

dowe (np. DEAE-, TEAE-, QAE-celulozę, DEAE-Sephadex itp.). Większe powinowactwo wersenianu do kationowych wymienników od powinowactwa immunoglobuliny A powoduje, że w obecności pierwszego z wymienionych albo nie zachodzi adsorpcja immunoglobuliny A na wymienniku, albo, gdy ta adsorpcja już nastąpiła uprzednio, zachodzi jej wypieranie z wymiennika. Wersenian, będąc słabiej wiązany przez wymiennik niż immunoglobulina M, nie ma wpływu na jej adsorpcję, o ile jego stężenie nie przekracza 0,02 M. Przy większych stężeniach wersenianu może zachodzić niekorzystny efekt zwiększania siły jonowej, powodujący również uwalnianie z wymiennika immunoglobuliny M.

Proces rozdzielania prowadzi się w dwojaki sposób: a) mieszaninę białek, zawierającą immunoglobuliny A i M, adsorbuje się na wymienniku kationowym, a następnie, zaadsorbowane immunoglobuliny A eluuje się roztworem soli wersenianowej o stężeniu od 0,005 M do 0,02 M; b) do roztworu białek, zawierających immunoglobuliny A i M dodaje się sole wersenianu do stężenia od 0,005 M do 0,02 M i adsorbuje się na wymienniku kationowym immunoglobuliny M, pozostawiając w roztworze niezaadsorbowane immunoglobuliny A. W obu przypadkach proces rozdzielania prowadzi się w pH powyżej 6,0 oraz przy sile jonowej, nie przekraczającej 0,17. Immunoglobuliny M, po usunięciu immunoglobuliny A, mogą być eluowane z wymiennika roztworami soli organicznych lub nieorganicznych o siłach jonowych powyżej 0,17, np. 0,3 M roztworem chlorku sodowego.

Ponieważ opisany proces jest procesem łagodnym i nie zagraża denaturacją białka, można go prowadzić zarówno w temperaturze niskiej, jak i pokojowej. W wyniku procesu otrzymywane są dwie frakcje, z których pierwsza zawiera immunoglobuliny A wolne od zanieczyszczeń immunoglobulinami M, a druga zawiera immunoglobuliny M wolne od immunoglobuliny A. Obie frakcje posiadają, poza wymienionymi immunoglobulinami, również inne białka surowicy. Oczyszczenie obu immunoglobulin od tych białek może być dokonane przy pomocy opisanych w literaturze metod (Vaerman i inni, 1963, Chaplin, 1965). Immunoglobuliny A i M nie wykazują po procesie rozdzielania różnic w ich własnościach fizykochemicznych.

Materiałem wyjściowym do rozdzielania immunoglobulin zgodnie ze sposobem według wynalazku może być nie tylko surowica ludzka lub zwierzęca, ale również frakcje surowicze jak np. frakcja globulinowa, otrzymana przez wysolenie części białek surowicy przy pomocy siarczanu amonu, lub III frakcja Cohna, otrzymywana przy frakcjonowaniu surowicy metodą etanolową (Cohn i inni, 1946).

Przykład I. Frakcję globulinową, otrzymaną z 1 000 ml surowicy ludzkiej przez wytrącenie siarczanem amonu przy 50% nasycenia, dializowano wobec 0,04 M buforu octanowo-amonowego, pH = 8,5, do wyrównania stężeń. Wydializowany roztwór, zawierający 19 g białka, nałożono na kolumnę z DEAE-celulozą o wymiarach 6,0×65 cm, zrównoważoną buforem użytym do dializy. Niezaadsorbowane białka wymyło, przepłukując kolumnę 2 litrami tego samego buforu. Zaadsorbowane na ko-

lumninie immunoglobuliny A wyeluowano, przemylając kolumnę 5 litrami 0,01 M roztworu wersenianu sodu, doprowadzonego do pH = 8,5. Eluent z kolumny zbierano przy pomocy kolektora frakcji.

Próbki, zawierające białko, połączono. Otrzymano 1.200 ml płynu, zawierającego 6,7 g białka, z czego 1,54 g stanowiły immunoglobuliny A. Roztwór ten, badany metodami immunochemicznymi, nie wykazywał obecności immunoglobuliny M. Po usunięciu frakcji, zawierającej immunoglobulinę A, kolumnę przemyto 3 litrami 0,3 M roztworu chlorku sodowego. Wypływający z kolumny roztwór białka zbierano przy pomocy kolektora frakcji. Łącząc próbki, zawierające białko, otrzymano 1.600 ml roztworu, zawierającego 4,2 g białka, z czego 1,05 g stanowiły immunoglobuliny M. Frakcja ta była wolna od immunoglobulin A.

Przykład II. 1.000 g pasty III frakcji Cohna, otrzymanej przy frakcjonowaniu surowicy ludzkiej metodą etanolową, zawierającej 240 g białka, rozpuszczono w 10 litrach schłodzonego do temperatury 0°C 0,04 M buforu octanowo-amonowego, pH = 9, zawierającego 0,01 M wersenian sodu. W uzyskanym roztworze zawieszono 1.000 g DEAE-celulozy, zrównoważonej uprzednio tym samym buforem. Zawiesinę mieszano wolno w temperaturze +4°C przez 3 godziny, a następnie DEAE-celulozę z zaadsorbowanym na niej białkiem odsączono pod próżnią. Otrzymano 9.200 ml przesączu, zawierającego 83 g białka, z czego 14 g stanowiły immunoglobuliny A. Przesącz pozbawiony był immunoglobulin M.

Odsączoną DEAE-celulozę przepłukano 2 litrami buforu octanowo-amonowego z wersenianem sodu i zawieszono w 5 litrach schłodzonego do temperatury +4°C 0,3 M roztworu chlorku sodowego. Po mieszanii zawiesiny przez 1 godzinę DEAE-celulozę odsączono i przeznaczono do regeneracji. Otrzymano 5.050 ml przesączu drugiego, zawierającego 96 g białka, z których 12,5 g stanowiły immunoglobuliny M. Roztwór ten nie wykazywał obecności immunoglobulin A.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób rozdzielania immunoglobulin klasy A od immunoglobulin klasy M na drodze rozdzielania chromatograficznego na kationowych wymiennikach jonowych, zawierających jako grupy czynne aminy II, III i IV rzędowe, **znamienny tym**, że mieszaninę białek, zawierającą immunoglobuliny A i M, adsorbuje się na wymienniku kationowym, po czym zaadsorbowane immunoglobuliny A eluuje się roztworem soli wersenianowej o stężeniu od 0,005 M do 0,02 M przy sile jonowej nie przekraczającej 0,17 i w pH powyżej 6,0, lub do roztworu białek, zawierającego immunoglobuliny A i M, dodaje się sole wersenianu do stężenia od 0,005 M do 0,02 M i immunoglobuliny M adsorbuje się na wymienniku kationowym przy sile jonowej nie przekraczającej 0,17 i w pH powyżej 6,0, pozostawiając w roztworze niezaadsorbowane immunoglobuliny A.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako roztwory rozdzielanych białek stosuje się surowice ludzkie i zwierzęce oraz frakcje białkowe, otrzymywane z tych surowic.