



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 30.05.74 (P. 171536)

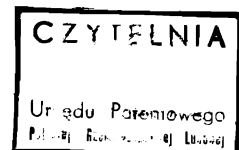
Pierwszeństwo _____

Zgłoszenie ogłoszono: 02.05.75

Opis patentowy opublikowano: 1.04.1977

MKP A61k 23/02
C07g 7/00

Int. Cl.² A61k 39/12
C07G 7/00



Twórcy wynalazku: Eugeniusz Jerzy Kościelak, Władysław Józwiak

Uprawniony z patentu: Instytut Hematologii, Warszawa (Polska)

Sposób otrzymywania antygeny Australia do celów szczepienia zwierząt

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania antygeny Australia z surowicy krwi człowieka, do celów szczepienia zwierząt. Antygen Australia (Au) (albo antygen zakaźnego zapalenia wątroby wywołanego przez wirus B) jest białkiem, które pojawia się we krwi ludzi, którzy albo chorują na żółtaczkę wszczepienną, względnie są jej nosicielami. Antygen wykrywa się w surowicy krwi przy pomocy surowic odpornościowych anty Au. Otrzymuje się je najczęściej przez szczepienie zwierząt (koni, kóz, królików) przy pomocy oczyszczonych preparatów antygeny Au.

Najczęściej antygen Australia otrzymuje się z krwi na drodze wirowania w ultrawirówce. Przy pomocy wielokrotnego wirowania cząsteczek antygeny w tzw. gradiencie gęstości można otrzymać preparaty, które są całkowicie wolne od innych białek osocza. Metoda ta jest mało przydatna do uzyskania większych ilości antygeny, niezbędnych do szczepienia dużych zwierząt laboratoryjnych. Ze względu na dużą zakaźność antygeny nie jest bowiem wskazane używanie metody wirowania w roztworze zonalnym, która jako jedyna pozwala na uzyskanie rzeczywiście dużych ilości antygeny przy pomocy wirówki. Dlatego do otrzymania antygeny próbowano stosować inne metody preparatyki, takie, jak: sączenie na kolumnach wypełnionych żelami, chromatografia powinowactwa, trawienie enzymami proteolitycznymi, wytrącanie siarczanem amonu, elektroforeza itp. Żadna z tych metod, za-

2

stosowana oddzielnie, z wyjątkiem może chromatografii powinowactwa, nie pozwala na uzyskanie rzeczywiście czystych preparatów antygeny. Zastosowanie chromatografii powinowactwa z użyciem surowicy anty-Au do celów preparacji antygeny jest jednak metodą kosztowną i trudną do przeprowadzenia w warunkach przemysłowych, ponieważ wymaga posiadania izolowanych preparatów gamma globuliny, zawierających przeciwciała anty-Au. Zastosowanie do chromatografii powinowactwa pełnej surowicy, zawierającej przeciwciała anty-Au, jest niecelowe, ponieważ antygen adsorbuje się w sposób nieswoisty na lipoproteidach. (W. Józwiak and J. Kościelak, Affinity Chromatography of RNA-Containing Preparations of Au Antigen, the Journal of Immunol., v. 110, 1151, 1973).

W praktyce stosuje się kombinację rozmaitych metod preparatyki antygeny, które zastosowane łącznie pozwolą na otrzymanie antygeny o żądanych właściwościach i stopniu czystości. Preparatyka antygeny Au do celów szczepienia koni według jednej ze znanych metod (V. J. Cabasso, R. Nieman, D. D. Schroeder, K. A. Hok, R. E. Louie and M. M. Mozen. Preparation and Standardization of an Australia Antigen Antibody of Equine Origin, Applied Microbiology, v. 21, 1017, 1971.) przedstawia się jak następuje: Surowicę, zawierającą antygen Australia poddaje się wstępnemu frakcjonowaniu etanolem według metody Cohna. Otrzymaną w ten sposób frakcję IV przepuszcza się przez kolumnę, wy-

pełnioną 6% agarozą w buforze glicynowo-cytrynianowym $\text{pH} = 7.5$. Frakcję białka, wypływającą w pustej objętości kolumny, zbiera się i zateża przez ultrafiltrację. Preparat zawiera jeszcze prawidłowe białka surowicy ludzkiej, na co wskazuje fakt, że otrzymaną po szczepieniu surowicę odpornościową należy absorbować aż trzema objętościami prawidłowej surowicy ludzkiej.

Celem wynalazku było opracowanie sposobu otrzymywania czystego antygeny Australia przy pomocy metody możliwej do zastosowania w zakładzie przemysłowym, a nie tylko w laboratorium naukowym. Metoda w najprostrzej już wersji pozwala na uzyskanie immunogennego preparatu antygeny, który powoduje powstawanie u koni przeciwciał anty-Au. Surowica taka zawiera jednak również i białka przeciw prawidłowym składnikom osocza ludzkiego i wymaga absorpcji kosztowną surowicą ludzką. Przez zastosowanie trawienia pronazą termicznie denaturowanych preparatów Au można otrzymać antygen, który jest w znacznej mierze wolny od białek surowicy człowieka. Całkowite oczyszczenie osiąga się przez wytrącanie białek surowicy ludzkiej przy pomocy przeciwciał anty-białka ludzkiego końskiej surowicy odpornościowej. Dwa ostatnie etapy wykonuje się przy użyciu odczynników (przeciwciał i enzymów), kowalentnie związanych z nierozpuszczalnym adsorbentem. Wynalazek dotyczy więc nie tyle nowych oryginalnych rozwiązań preparatowych, co doboru i sekwencji poszczególnych etapów preparatyki, co pozwala na otrzymanie produktu o właściwym stężeniu i żądanej czystości.

Cel ten został osiągnięty przez opracowanie sposobu, polegającego na tym, że częściowo oczyszczony od białek surowicy ludzkiej preparat antygeny Au poddaje się denaturacji technicznej przez 15 minut w temperaturze 80°C , a następnie po oziębieniu poddaje się trawieniu pronazą w postaci nierozpuszczalnej, korzystnie sprzęgniętej z agarozą, na przykład Sefarozą (produkt firmy Pharmazia, Upsala) po czym białka surowicy ludzkiej obecne w preparacie antygeny Au usuwa się przez dodawanie przeciwciał anty-białka surowicy ludzkiej w postaci

nierozpuszczalnej, korzystnie sprzęgniętych z agarozą, na przykład Sefarozą.

Sposób izolacji antygeny Australia z surowicy ludzkiej według wynalazku przedstawia się, jak następuje: z surowicy, zawierającej antygen, wytrąca się antygen przy pomocy $45\% \text{NH}_4\text{SO}_4$ w temperaturze $0-4^{\circ}\text{C}$. Odwirowuje się osad przy około 3000 obrotów na minutę w temperaturze 0°C i nadsącz odrzuca się. Osad rozpuszcza się w wodzie destylowanej. Roztwór przepuszcza się przez kolumnę, wypełnioną Sefadexem G-200, stosując jako eluent bufor fosforanowy o $\text{pH} = 7.2$ w $0.9\% \text{NaCl}$. Frakcję białka, wypływającą w pustej objętości kolumny, zbiera się i ogrzewa przez 15 minut w temperaturze 80°C . Oziębia się i poddaje trawieniu pronazą, związaną kowalentnie z Sefarozą 4B. Po zakończeniu trawienia roztwór przesącza się przez szklany sączek i zateża przez ultrafiltrację. Następnie dodaje się Sefarozę 4B, zawierającą przyłączone kowalentnie przeciwciała końskie anty-białka surowicy ludzkiej, odsącza się i proces ten powtarza się pięciokrotnie. W otrzymanym roztworze, zawierającym izolowany antygen Au określa się metodą immunodyszfuzji miano antygeny Au. Preparat powinien być całkowicie wolny od prawidłowych białek surowicy ludzkiej. Immunodyszfuzję wykonuje się w 0.9% żelu agarowym wobec surowicy, zawierającej anty-Au w buforze 0.1 M NaCl , 0.001 M TRIS , 0.001 M EDTA , 0.1% mertiolat, pH doprowadzone do 7,6 przy pomocy HCl .

Zastrzeżenie patentowe

Sposób otrzymywania antygeny Australia do celów szczepienia zwierząt, **znamienny tym**, że częściowo oczyszczony od białek surowicy ludzkiej preparat antygeny Au poddaje się denaturacji termicznej przez 15 minut w temperaturze 80°C , a następnie po oziębieniu poddaje się trawieniu pronazą w postaci nierozpuszczalnej, korzystnie sprzęgniętej z agarozą taką jak Sefarozą, po czym białka surowicy ludzkiej, obecne w preparacie antygeny Au, usuwa się przez dodawanie przeciwciał anty-białka surowicy ludzkiej w postaci nierozpuszczalnej, korzystnie sprzęgniętych z agarozą taką, jak Sefarozą.