

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY PATENTU TYMCZASOWEGO

108540

Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 08.11.77 (P. 201979)

Pierwszeństwo: _____

Int. Cl.² A61K 39/02

Zgłoszenie ogłoszono: 25.09.78

Opis patentowy opublikowano: 31.01.1981

CZYTELNICIA

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórcy wynalazku: Ina Buchowicz, Halina Januszewska, Małgorzata Kalicińska-Buraczewska,
Michał Korbecki, Halina Niemczyk, Krystyna Owczarska,
Barbara Schiller

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

Sposób otrzymywania oczyszczonej anatoksyny błoniczej

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania oczyszczonej anatoksyny błoniczej z anatoksyny natywnej, uzyskanej w hodowlach głębinowych na płynnym podłożu, zawierającym proteolizat serc wołowych lub wieprzowych.

Anatoksyna błonicza jest niefekcyjnym preparatem białkowym o wysokiej aktywności immunogennej i antygenowej. Znajduje ona szerokie zastosowanie w lecznictwie jako składnik szczepinek pojedynczych i skojarzonych, używanych do masowych szczepień ochronnych przeciwko błonicy.

Stan techniki. Produkcja anatoksyny błoniczej polega na hodowli toksynotwórczego szczepu *Corynebacterium diphtheriae* na płynnym podłożu, zawierającym proteolizat białkowy np. proteolizat kazeiny, mięsa wołowego, serc wołowych lub wieprzowych. Po osiągnięciu odpowiednio wysokiego miana toksyny, oddziela się komórki bakteryjne od przesączu, w którym znajduje się toksyna błonicza oraz inne rozpuszczalne produkty metabolizmu *Corynebacterium diphtheriae* i składniki podłoża. Dalsze postępowanie może być prowadzone dwoma metodami:

— Do przesączu hodowli *Corynebacterium diphtheriae* dodaje się 0,3 – 0,4% formaldehydu i inkubuje mieszaninę w temperaturze 37–40°C. Prowadzi to do stopniowego zaniku właściwości toksycznych i powstawania nietoksycznej i stabilnej substancji – anatoksyny błoniczej lub toksoidu błoniczego według nomenklatury angielskiej i amerykańskiej). Po całkowitym zakończeniu procesu detoksykacji otrzymuje się tzw. natywną (czyli nieoczyszczoną) anatoksynę błoniczą, którą następnie poddaje się frakcjonowaniu celem otrzymania oczyszczonego preparatu anatoksyny. W warunkach produkcyjnych frakcjonowanie natywnych anatoksyn polega najczęściej na wytrąceniu białka siarczanem amonu w środowisku słabo alkalicznym lub wytrąceniu kwasami (octowym, trójchlorooctowym, fosforowym) przy pH = 3,8–4,0. Uzyskane w ten sposób preparaty wykazują znaczną heterogenność, a ich aktywność właściwa jest stosunkowo niska i wynosi najczęściej 800–1300 Lf/mg azotu białkowego (Rethy i współpr. Progr. Immunobiol. Stand. 2,27, 1965).

— Z przesączu hodowli *Corynebacterium diphtheriae* otrzymuje się wysoko oczyszczoną toksynę, którą następnie poddaje się detoksykacji formaldehydem w obecności lizyny. Pozwala to uzyskać jednorodne

preparaty o wysokiej aktywności właściwej (2000–3400 Lf/mg azotu białkowego), ale stwarza poważne trudności produkcyjne ze względu na znaczną toksyczność i labilność toksyny błoniczej.

Wynalazek niniejszy dotyczy metody otrzymywania oczyszczonej anatoksyny błoniczej z przesączu hodowli *Corynebacterium diphtheriae* poddanego całkowitej detoksykacji formaldehydem, a więc otrzymywania oczyszczonego preparatu z nietoksycznej anatoksyny natywnej.

Dotąd stosowana metoda frakcjonowania polega na dodaniu do natywnej anatoksyny błoniczej kwasu tróchlorooctowego do $\text{pH} = 3,8 \pm 0,1$. W warunkach tych do osadu przechodzi anatoksyna błonicza oraz znaczna ilość składników balastowych m. inn. białek, peptydów i substancji barwnych. Po dokładnym odwirowaniu osad rozpuszcza się w buforze boranowym o $\text{pH} = 7,5$, którego ilość stanowi 1/35 objętości materiału wyjściowego przed frakcjonowaniem. Uzyskany roztwór poddaje się adsorpcji na węglu aktywowanym celem usunięcia substancji barwnych (głównie porfiryń). Otrzymana w ten sposób częściowo oczyszczona i zateżona anatoksyna o aktywności właściwej 1000–1400 Lf/mg azotu białkowego jest jednak preparatem heterogennym i zawiera, oprócz frakcji o wysokiej aktywności, również nieaktywne składniki balastowe. Obecność tych substancji obniża aktywność preparatu i zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia odczynów poszczepiennych u dzieci. Należało więc opracować metodę dodatkowego oczyszczania anatoksyny błoniczej, prowadzącą do uzyskania wysoko aktywnych preparatów, pozbawionych nieczynnych składników balastowych.

Istota wynalazku. Poszczególne frakcje białkowe natywnej anatoksyny błoniczej a więc składniki balastowe i frakcja aktywna, różnią się od siebie pod względem ładunku elektrycznego, z którym związane jest powinowactwo do wymienniczy jonowych. Wyzyskując tę cechę poszczególnych frakcji białkowych, sposobem według wynalazku, osiągnięto pożądany cel uzyskania wysoko aktywnych preparatów anatoksyny, pozbawionych składników balastowych, drogą zastosowania dodatkowego chromatograficznego oczyszczania zateżonej i częściowo oczyszczonej anatoksyny błoniczej na wymienniczu – DEAE–Sefadeksie A–50 (dwuetyloaminoetylowej pochodnej usieciowanego dekstranu) oraz dobrania takich warunków chromatografii, w których aktywna frakcja anatoksyny nie jest na sefadeksie, natomiast nieaktywne białka balastowe wiążą się z sefadeksem i w ten sposób zostają usunięte z preparatu.

Wyjaśniając bardziej szczegółowo, istota wynalazku polega na tym, że częściowo oczyszczona i zateżona anatoksyna błonicza, otrzymana według dotąd stosowanej metody poddawana jest dodatkowemu oczyszczaniu na DEAE–Sefadeksie A–50 w 0,2 molowym buforze octanowym o $\text{pH} = 5,1–5,2$ zawierającym 0,25–0,40 mol/litr chlorku sodowego. Główna frakcja anatoksyny błoniczej pozostaje w roztworze, natomiast białka o wysokim ładunku ujemnym wiążą się z DEAE–Sefadeksem A–50. Po oddzieleniu sefadeksu otrzymuje się roztwór oczyszczonej anatoksyny o aktywności właściwej około 2000 Lf/mg azotu białkowego. Warunki oczyszczania anatoksyny błoniczej na DEAE–Sefadeksie A–50 (stężenie buforu, pH , stężenie chlorku sodowego i temperatura) są tak dobrane, że wydajność procesu jest powtarzalna i wynosi nie mniej niż 70% jednostek flokulacyjnych Lf, a ostateczny produkt w całości odpowiada wymaganiom stawianym przed tego rodzaju preparatami w lecznictwie.

Sposób według wynalazku polega na tym, że do natywnej anatoksyny błoniczej dodaje się kwas tróchlorooctowy do $\text{pH} = 3,8 \pm 0,1$. Utworzony osad po odwirowaniu rozpuszcza się w 0,2 molowym roztworze octanu sodowego i odbarwia na węglu aktywowanym w $\text{pH} = 7,5$. Do odbarwionego roztworu częściowo oczyszczonej i zateżonej anatoksyny dodaje się 0,2 molowy roztwór kwasu octowego do $\text{pH} = 5,1–5,2$ i chlorek sodowy do stężenia 0,25–0,40 mol/litr, a następnie przeprowadza się oczyszczanie preparatu w temperaturze pokojowej na DEAE–Sefadeksie A–50, uprzednio zrównoważonym 0,2 molowym buforem octanowym o $\text{pH} = 5,1–5,2$ zawierającym 0,25–0,40 mol/litr chlorku sodowego. Płyn, w którym znajduje się aktywna frakcja anatoksyny błoniczej, oddziela się od sefadeksu i w razie potrzeby przygotowania zateżonej anatoksyny (o aktywności 1000 Lf/MI lub wyżej), doprowadza się do $\text{pH} = 3,8 \pm 0,1$ kwasem tróchlorooctowym celem wytrącenia i koncentracji oczyszczonej anatoksyny błoniczej. Utworzony osad po odwirowaniu rozpuszcza się w buforze boranowym o $\text{pH} = 7,5$ i poddaje się sączeniu sterylizującemu.

Tabela przedstawia porównanie czystości preparatów anatoksyny błoniczej, miarą której jest aktywność właściwa w Lf/mg azotu białkowego, otrzymanych dotąd stosowaną metodą (preparat handlowy) oraz opracowaną metodą chromatograficzną (preparat po DEAE–Sefadeksie A–50).

Przedstawiona tabela wskazuje, że preparaty uzyskane za pomocą metody będącej przedmiotem niniejszego wynalazku, posiadają wyższą aktywność właściwą, tzn. są preparatami o wyższym stopniu czystości, niż anatoksyny handlowe. Skaznik oczyszczania na DEAE–Sefadeksie A–50 dla poszczególnych serii anatoksyn wynosił $1,6 \pm 0,13$.

P r z y k ł a d I. Otrzymywanie anatoksyny błoniczej oczyszczonej na DEAE–Sefadeksie A–50 (dwuetyloaminoetylowej pochodnej usieciowanego dekstranu) metodą „batch”.

Hodowlę głębinową *Corynebacterium diphtheriae* prowadzono na płynnym podłożu, zawierającym proteolizat serc wołowych lub wieprzowych. Przesącze hodowli poddane całkowitej detoksykacji formaldehy-

dem (tzw natywne anatoksyny błonicze) były materiałem wyjściowym do otrzymywania oczyszczonych preparatów. Zawierały one około 100 Lf/ml, a ich aktywność właściwa wynosiła 155 ± 30 Lf/mg azotu białkowego. Do 70 litrów natywnej anatoksyny błoniczej, schłodzonej do temperatury $4-7^{\circ}\text{C}$, dodano przy stałym mieszanii 7 litrów 20% roztworu kwasu trójchlorooctowego do $\text{pH} = 3,8 \pm 0,1$. Anatoksynę pozostawiono na 20 godzin w temperaturze $4-7^{\circ}\text{C}$, po czym osad odwirowano. Osad rozpuszczono w 2 litrach 0,2 molowego roztworu octanu sodowego. Otrzymano koncentrat I częściowo oczyszczonej i zatężonej anatoksyny błoniczej o $\text{pH} 5,5-5,6$, do którego przy stałym mieszanii dodano 63 ml i molowego roztworu wodorotlenku sodowego (do $\text{pH} = 7,5$, i 60 węglu aktywowanego. Mieszaninę wytrząsano przez 60 minut w temperaturze pokojowej, wirowano przy 3000 obr/min i uzyskany koncentrat II klarowano drogą sączenia przez świecę Berkefelda. Do 1800 ml klarownego koncentratu II dodano 450 ml 0,2 molowego roztworu kwasu octowego i 41,7 g stałego chlorku sodowego, a następnie — 2200 g mokrego DEAE—Sefadeksu A—50, uprzednio zrównoważonego 0,2 molowym buforem octanowym o $\text{pH} = 5,1-5,2$, zawierającym 0,25—0,40 mol/litr chlorku sodowego. Chromatografię jonowymienną prowadzono, mieszając anatoksynę błoniczą z DEAE—Sefadeksem A—50 w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Po zakończeniu procesu oczyszczania mieszaninę przeniesiono na lejek Schotta w celu oddzielenia aktywnej frakcji anatoksyny błoniczej, znajdującej się w roztworze, od sefadeksu zawierającego związane składniki balastowe. Sefadeks przemywano na lejku Schotta sześcioma litrami buforu wyjściowego (0,2 molowy bufor octanowy o $\text{pH} = 5,1-5,2$, zawierający 0,25—0,40 mol/litr chlorku sodowego) i uzyskany płyn połączono z podstawowym roztworem oczyszczonej anatoksyny. Otrzymano 8500 ml anatoksyny oczyszczonej na DEAE—Sefadeksie A—50, do której dodano przy stałym mieszanii 800 ml 20% roztworu kwasu trójchlorooctowego celem wytrącenia i koncentracji oczyszczonej anatoksyny. Mieszaninę pozostawiono na 20 godzin w temperaturze $4-7^{\circ}\text{C}$ po czym odwirowano osad, rozpuszczono go w 2 litrach buforu boranowego o $\text{pH} = 7,5$ i dodano 25 ml molowego roztworu wodorotlenku sodu do $\text{pH} = 7,5$ oraz mertiolat do stężenia 1 : 10000. Koncentrat oczyszczonej anatoksyny błoniczej, zawierający 1500—2000 Lf/ml, poddano sączeniu sterylizującym.

Przykład II. Otrzymanie anatoksyny błoniczej, oczyszczonej na DEAE—Sefadeksie A—50 (dwuetyloaminoetylowej pochodnej usieciowanego dekstranu) drogą chromatografii kolumnowej. Do 90 ml odbarwionego roztworu częściowo oczyszczonej i zatężonej anatoksyny błoniczej, otrzymanej jak w przykładzie I dodano 22 ml 0,2 molowego roztworu kwasu octowego i 2,1 g stałego chlorku sodowego. Tak przygotowany roztwór o $\text{pH} = 5,1-5,2$ nałożono na kolumnę (2,5X25 cm) zawierającą 3 g DEAE—Sefadeksu A—50 w buforze wyjściowym, którym był 0,2 molowy bufor octanowy, zawierający 0,25—0,40 mol/litr chlorku sodowego. Proces chromatograficzny prowadzono w temperaturze pokojowej, szybkość przepływu anatoksyny przez wymiennik wynosiła 30—40 ml/godzinę. Zbierano frakcję białkową, która nie była wiązana na DEAE—Sefadeksie A—50. Zawierała ona oczyszczoną anatoksynę błoniczą o aktywności właściwej około 2000 Lf/mg azotu białkowego. Frakcję tę dializowano do 0,15 molarnego roztworu chlorku sodowego, a następnie roztwór zawierający 500—700 Lf/ml, poddawano sączeniu sterylizującym.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób otrzymywania oczyszczonej anatoksyny błoniczej z natywnej anatoksyny, uzyskanej w hodowlach głębinowych na płynnym podłożu, zawierającym proteolizat serc wołowych lub wieprzowych i poddanej częściowemu oczyszczeniu i zagęszczeniu metodą wytrącania kwasem trójchlorooctowym i adsorpcji substancji barwnych na węglu aktywowanym, z n a m i e n n y t y m, że odbarwiony roztwór częściowo oczyszczonej i zagęszczonej anatoksyny błoniczej doprowadza się do $\text{pH} = 5,1-5,2$ przez dodanie 0,2 molowego roztworu kwasu octowego i składniki balastowe usuwa się z preparatu drogą chromatografii jonowymienną na dwuetyloaminoetylowej pochodnej dekstranu w 0,2 molowym buforze octanowym o $\text{pH} = 5,1-5,2$ zawierającym 0,25—0,40 mol/litr chlorku sodowego w temperaturze pokojowej.

T a b e l a

Seria anatoksyny błoniczej	Aktywność właściwa — Lf/mg azotu białkowego		Wskaźnik oczyszczania na DEAE—Sefadeksie A—50
	preparat handlowy	preparat po DEAE—Sefadeksie A—50	
ser. 1	1450	2160	1,48
ser. 2	1430	2330	1,63
ser. 3	1294	2240	1,73