



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 28.09.73 (P. 165486)

Pierwszeństwo _____

Zgłoszenie ogłoszono: 02.05.75

Opis patentowy opublikowano: 30.08.1977

MKP A61k 23/00

Int. Cl.² A61K 39/00

Twórcy wynalazku: Ina Buchowicz, Halina Goch, Halina Januszewska,
Małgorzata Kalicińska-Buraczewska, Stanisława Sa-
balińska, Barbara Schiller, Kazimierz Zakrzewski,
Barbara Samojłowa

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

Sposób otrzymywania leczniczych preparatów antytoksynowych

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania leczniczych preparatów antytoksynowych, w postaci czynnych fragmentów przeciwciał, z surowicy uodpornionych zwierząt, zwłaszcza koni.

Preparaty antytoksynowe stanowią jeden z ważniejszych środków leczniczych i profilaktycznych, stosowanych w schorzeniach, wywołanych działaniem toksyn pochodzenia biologicznego np. takich, jak błonica, tężec, przy pokąsaniu przez żmije i w wielu innych przypadkach.

Produkcja preparatów antytoksynowych do celów leczniczych polega na uodpornianiu zwierząt, a zwłaszcza koni, odpowiednimi toksynami lub toksoidami (tj. toksynami, pozbawionymi zjadliwości), aż do osiągnięcia pożądanego poziomu przeciwciał w surowicy. Po zakończeniu cyklu immunizacji od zwierząt pobiera się surowicę i przeciwciała oddziela się od pozostałych białek przez wysalanie. W celu zmniejszenia reaktywności otrzymanego preparatu wysalanie poprzedza się na ogół ostrożnym trawieniem proteolitycznym, które nie wpływa w sposób istotny na aktywność antytoksyniczną surowicy. Postępowanie to jednak nie pozwala nigdy na wyodrębnienie przeciwciał swoistych wyłącznie dla antygeny, przeciwko któremu surowica ma być środkiem leczniczym.

W najlepiej oczyszczonych preparatach antytoksynowych do celów leczniczych (tzw. antytoksynach), swoiste przeciwciała stanowią nie więcej, niż 20%—30% ogólnej ilości białka. Terapeutyczne sto-

2

sowanie takich preparatów prowadzi więc do wprowadzenia do organizmu człowieka znacznych ilości zbędnych — a jako obcogatunkowych — potencjalnie szkodliwych białek. Duże stężenie białka w preparacie antytoksyny sprawia również, że albo trzeba je wstrzykiwać w postaci roztworów o wysokiej lepkości, albo rozcieńczać do dużej objętości, co pociągają za sobą znaczną bolesność i niebezpieczeństwo miejscowych lub uogólnionych zaburzeń krążenia.

Dla usunięcia tych trudności próbowano wydziełać przeciwciała na drodze swoistej. W obecności właściwego antygeny przeciwciała tworzą z nim nierozpuszczalny kompleks, z którego można je odzyskać przez dysocjację w środowisku kwaśnym, alkalicznym lub innym. Sposób ten nie daje jednak pożądanego rezultatu, ponieważ czynniki dysocjujące kompleks denaturują jednocześnie przeciwciała tak, że wydajność procesu jest bardzo niska.

Jak to już wyżej powiedziano, przeciwciała mogą być poddane trawieniu proteolitycznemu bez utraty aktywności. Przeciwciała, zmodyfikowane w wyniku trawienia proteolitycznego (tzw. fragmenty przeciwciał), jest znacznie bardziej odporne na działanie, przynajmniej niektórych, czynników dysocjujących kompleks antygen-przeciwciała.

Wynalazek niniejszy oparty jest o tę właśnie cechę proteolitycznie zmodyfikowanego przeciwciała i prowadzi do otrzymywania preparatu, w którym obecne są tylko swoiste fragmenty przeciwciała, tj.

zdolne do reagowania z danym antygenem (toksyną).

Istota wynalazku polega na tym, że uzyskany na drodze trawienia proteolitycznego frągment czynny przeciwciała wychwytyuje się z roztworu przez swoiście wiążący się z przeciwciałem antygen, ale uprzednio związany z nierozpuszczalnym nośnikiem (np. rozdrobnionym żelem agarozowym). W czasie kontaktu żelu z surowicą, trawioną proteolitycznie, następuje swoiste wiązanie przeciwciała z nierozpuszczalnym nośnikiem za pośrednictwem łącznika, którym jest antygen (toksoid lub toksyna). Ponieważ reakcja między toksyną a przeciwciałem jest odwracalna (w odróżnieniu od nieodwracalnego wiązania antygeny z nośnikiem), możliwe jest rozszczepienie kompleksu przeciwciało-antygen-nośnik i oddzielenie czynnego fragmentu od antygeny, a zatem i od nośnika. Po regeneracji nośnik nadaje się do powtórnego użytku.

Ujemną cechą stosowanych dotąd procesów chromatograficznych jest to, że do elucji stosowano dość stężone roztwory soli oraz kwasy około 0,1 molarne. To, w zestawieniu ze stosunkowo niskim stężeniem eluowanego białka sprawia, że oczyszczony preparat przed zagęszczaniem musi się pozbawiać nadmiaru elektrolitów np. za pomocą dializy. Jest to proces kłopotliwy, często prowadzący do strat materiału i pojawiania się ciał gorączkotwórczych w preparacie końcowym. W metodzie wg niniejszego wynalazku trudność tę usunięto przez zastosowanie rozcieńczonego kwasu solnego o stężeniu, nie przekraczającym 0,01 M, uzupełnionego niewielką, poniżej 0,01 M/l, ilością chlorku sodu o stężeniu tak dobranym, że wydajność procesu jest wysoka, a ostateczny preparat, nawet zagęszczony do stężenia 15 g/100 ml, zawiera dopuszczalne w lecznictwie (izotoniczne) stężenie chlorku sodu.

Proces technologiczny przebiega w sposób następujący. Przygotowuje się nośnik przez aktywowanie bromocyjanem rozdrobnionego żelu agarozowego, do którego dodaje się antygen (toksoid lub toksynę). Nośnik umieszcza się w kolumnie szklanej i nakłada się na niego surowicę odpornościową. Po odpłukaniu białek balastowych fragmenty czynne, związane z nośnikiem, eluuje się rozcieńczonym kwasem solnym, zawierającym niewielką ilość chlorku sodu. Otrzymany roztwór zobojętnia się do pH = 7,0 i suszy ze stanu zamrożenia.

Poniższa tabela wykazuje na podstawie aktywności preparatów antytoksynowych (liczonej w jednostkach flokulacyjnych (Lf) na ml 15% roztworu), że preparat, uzyskany sposobem według wynalazku jest około 5-krotnie bardziej oczyszczony, niż preparat handlowy (tzw. oczyszczona antytoksyna).

T a b e l a

Preparat	Surowica odpornościowa	
	błonicza Lf/ml *	tężcowa Lf/ml *
Handlowy (wytrącony siarczanem amonu)	1850	4200
Otrzymany na kolumnie	8650	24000

*) roztwór zawierający 15g białka w 100 ml

Przykład I. Otrzymywanie przeciwbłoniczych preparatów antytoksynowych do celów leczniczych.

Nośnik przygotowano ogólnie stosowaną metodą, polegającą na aktywowaniu bromocyjanem rozdrobnionego żelu agarozowego i przyłączeniu do niego toksoidu błoniczego. Do 1000 ml aktywowanego żelu agarozowego dodano 180 ml toksoidu błoniczego, zawierającego 3000 jednostek flokulacyjnych (Lf) w 1 ml. Żel przeniesiono do kolumny szklanej o wymiarach 20×8,5 cm. 4,5 l natywnej surowicy końskiej przeciwbłoniczej rozcieńczono w stosunku 1:2 0,15 M chlorkiem sodu, doprowadzono pH do 3,2 i trawiono pepsyną przez 30 minut w temperaturze 30°C. Zobojętnioną mieszaninę przesączono natychmiast przez wyjałowiony filtr.

Całą w ten sposób otrzymaną mieszaninę o objętości 13,5 l, zawierającą około 800 000 Lf nakładano na kolumnę z szybkością 1—1,5 l na godzinę. Po przejściu mieszaniny, kolumnę przepłukano 0,15 M roztworem chlorku sodu. Fragment czynny przeciwciała błoniczego eluowano roztworem, zawierającym 0,005 M roztwór kwasu solnego i 0,005 M roztwór chlorku sodu (pH = 2,7—2,8). Wyływający z kolumny roztwór fragmentu czynnego przeciwciała natychmiast zobojętniano 0,1 M roztworem wodorotlenku sodu do pH = 7,0 i poddano liofilizacji. Zawierał on 55% ogólnej ilości przeciwciał, związanych z nośnikiem, a jego aktywność właściwa wynosiła 70 Lf/mg białka. W wielu przeprowadzonych doświadczeniach wydajność przeciwciał z kolumny była w granicach od 55 do 65%, a aktywność właściwa od 50 do 70 Lf/mg białka.

Pozostałe na kolumnie przeciwciała były mocno związane z nośnikiem i dlatego nie mogły być odzyskane w tych warunkach. Do następnego użycia nośnik regenerowano 6 M roztworem mocznika w 0,1 M roztworze HCl, a następnie płukano 0,15 M roztworem chlorku sodu o pH = 7,0. W czasie regeneracji w płynie, wypływającym z nośnika, stwierdzono obecność przeciwciał, ale nie używano ich do przygotowania preparatów antytoksynowych do celów leczniczych.

Przykład II. Otrzymywanie przeciwtężcowych preparatów antytoksynowych do celów leczniczych. Natywną surowicę końską przeciwtężcową trawiono w podobny sposób, jak opisano w przykładzie I, a następnie oddzielono od białek balastowych przez wysolenie siarczanem amonu. Wytrącone przeciwciała odwirowano, rozpuszczono i dializowano do wody. Przeciwciała, zobojętniające toksynę tężcową, wyodrębniono na kolumnie, wypełnionej rozdrobnionym żelem agarozowym, zawierającym nieodwracalnie związany toksoid tężcowy (w sposób taki, jak opisano w przykładzie I). Aktywację żelu agarozowego, podstawienie toksoidu tężcowego, nakładanie białka na kolumnę oraz wymywanie przeciwciał tężcowych przeprowadzono w sposób podany w przykładzie I. Wydajność, wyliczana w stosunku do ogólnej ilości jednostek przeciwtężcowych, związanych przez nośnik, wynosiła 60%. Aktywność właściwa otrzymanego preparatu wynosiła 175 Lf/mg białka.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób otrzymywania leczniczych preparatów antytoksycznych w postaci czynnych fragmentów przeciwciał z surowicy uodpornionych zwierząt, zwłaszcza koni, po proteolitycznym trawieniu tych surowic, **znamienny tym**, że fragmenty czynne prze-

5

ciwciał wychwytyje się za pomocą swoistego anty-genu, kowalencyjnie związanego z nierozpuszczalnym nośnikiem, a następnie eluuje się za pomocą roztworu HCl o stężeniu, nie przekraczającym 0,01 M, zawierającego chlorek sodu w ilości poniżej 0,01 M/l.