



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY

A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

202 181

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 16 11 77
(21) PV 7539-77

(51) Int. Cl.³ A 61 K 37/18 //
C 07 G 7/00

(40) Zveřejněno 30 04 80
(45) Vydáno 01 04 83

(75)

Autor vynálezu ŠTĚPÁNEK IVAN Ing CSc., ŠARIŠSKÉ MICHAĽANY

(54) Způsob odstraňování nízkomolekulárních sloučenin z roztoku krevního albumínu

1

Poznání skutečnosti, že albumínová frakce krevních bílkovin je zodpovědná za udržování osmotické rovnováhy v organismu způsobilo, že albumínový roztok, upravený do infusní formy o koncentraci bílkovin 5 nebo 20% se stal jedním z nejčastěji užívaných preparátů, vyrobených z krevní plazmy. Až dosud se při výrobě albumínu kladl důraz na jeho výtěžnost a na elektroforetickou čistotu. Základní podmínkou pro klinickou efektivnost účinku albuminového preparátu je co nejnížší obsah nízkomolekulárních anorganických nebo organických sloučenin, které se do albuminového roztoku dostávají v souvislosti s jeho technologickou formou separace. Vynález řeší způsob odstraňování těchto sloučenin z roztoku krevního albumínu.

Na precipitaci albumínu ze směsi plasmatických nebo sérových krevních bílkovin byl použit síran amonný/Schultze H., Schönenberger M., Matheke H.D.: Behringwerke Mitt. 26, 21, 1952; Dietzel E., Geiger H.: Behringwerke Mitt. 43, 129, 1964/, polymetafosfát/Nitschman H.S., Rickli E., Kistler P.: Vox Sang. 5, 232, 1960/, trichloroctová kyselina/Michel S.E.; Biochem. J. 82, 212, 1962/, kaprylát/Hoch H., Chanutin A.: Arch. Biochem. Biophys. 51, 271, 1954/, aceton/Schwert G.W.: J. Amer. Chem. Soc. 79, 139, 1957 /, éter/Kekwitz R.A., Mc Kay M.E., Nance M.H., Record B.R.: Biochem. J. 60, 671, 1955 /, etanol/Cohn E.J., Strong L.E., Hughes W.L., Mulford D.J., Ashworth J.N., Melin M., Taylor H.L.: J. Amer. Chem. Soc. 68, 459, 1946; Taylor H.L., Bloom F.C., Mc Call K.B., Hyndman L.A.: J. Amer. Chem. Soc. 78, 1353, 1956/, etanol spolu se Zn^{++} a Ba^{++} /Cohn E.J., Gurd F.N.R., Surgener D.M., Barnes B.A., Brown R.K., Derounaux G., Gillespie J.M., Kahnt F.W., Lewer W.F., Liu C.H., Mittelman D., Mouton R.F., Schmid K., Uroma E.: J. Amer. Chem.

202 181

Soc. 72,465,1950/ a ionty Zn^{++} /Cohn E.J., Tullis J.L., Surgener D.M., D'Hont M.: Science 114,479,1951/.

Současná technologická praxe však na jedné straně sice odděluje albumin od směsi jiných krevních bílkovin, ale na druhé straně zanáší do albuminového roztoku nízkomolekulární anorganické nebo organické sloučeniny. Technologický postup může taktéž část některých nízkomolekulárních sloučenin s biochemickofyziologickou aktivitou v roztoku koncentračně obohacovat vzhledem k jejich koncentraci ve výchozí surovině, ze které byl albumin izolován.

Přítomnost netěkavých anorganických solí snižuje v injekčním roztoku albuminu jeho osmotickou kapacitu. Přítomnost netěkavých nízkomolekulárních organických molekul v roztoku albuminu vytváří předpoklady pro vznik nežádoucích interakcí těchto látek s molekulami albuminu, a to zejména při lyofilizaci nebo pasteurizaci, popřípadě v průběhu skladování v podobě terapeutického preparátu.

Nedostatkem dosud užívané technologie je skutečnost, že takto připravené lyofilizované preparáty obsahují $2,5 \pm 0,5$ % sodíku, který citelně snižuje klinický efekt preparátu, zejména při odčerpávání tekutin tělesných tkání za patologických podmínek.

U nově navrhované technologie se tyto potíže nevyskytovaly v tak výrazné intenzitě, což lze dokumentovat údajem, že z 10 připravených experimentálních šarží podle předloženého vynálezu bylo dosaženo snížení sodíku u lyofilizovaného preparátu o 95 % až 99,9 % ve srovnání s tímž materiálem, který byl lyofilizován bez předcházející separace nízkomolekulárních sloučenin.

Podstata odstraňování nízkomolekulárních sloučenin z roztoku krevního albuminu spočívá podle předloženého vynálezu v tom, že bílkovinný materiál, obsahující purifikovaný albumin se suspenduje za aseptických podmínek v takovém množství destilované apyrogenní vody o teplotě 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$, aby hodnota koncentrace bílkovin se nacházela v rozmezí 2 % až 15 % s optimem $8\% \pm 2\%$, albuminový roztok se vyčerpá například filtrací a separace nízkomolekulárních sloučenin z albuminového roztoku se provádí eluční gelovou chromatografií s vylučovací mezí gelu, vyjádřenou molekulovou hmotností nízkomolekulárních sloučenin do 10.000, pomocí eluce s destilovanou apyrogenní vodou anebo s roztokem chloridu sodného v destilované apyrogenní vodě v koncentraci až 0,9 %, s optimem jen v destilované apyrogenní vodě o teplotě 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$ s hodnotou pH v rozmezí 4,0 až 6,0 při průtoku 0,01 ml až 3,0 ml za minutu na cm^2 výtokové plochy gelové části kolony.

Za optimální průtok je možno považovat objem v rozmezí od 0,05 ml do 1 ml za minutu na cm^2 , kdy vzniká naředění na čele a konci výtoku bílkoviny z kolony, při čemž cca 80 % naloženého objemu roztoku bílkovin vytéká z kolony prakticky v té koncentraci, v jaké byl roztok bílkovin na kolonu nasazen. Průtoky kolem 5 ml za minutu na cm^2 /Friedli H., Kistler P.: Chimia 26,25,1972/ způsobují naředění roztoku více než na dvojnásobný objem.

Z gelové chromatografické kolony vyteklý albuminový roztok se podrobí sterilizaci, například filtrací nebo radiační sterilizaci a potom dalšímu zpracování, například lyofilizaci nebo zakonzentrování pomocí vakuové destilace, popřípadě pomocí membrán.

Vynález je dále objasněn na příkladech provedení, jimiž jeho obsah není ani omezen,

ani vyčerpán.

Příklad 1

Výchozí surovinou je pasta frakce V, izolovaná podle Cohna. Bílkovinný albuminový materiál se rozpouští v takovém množství destilované apyrogenní vody o teplotě 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$, aby hodnota koncentrace bílkovin se nacházela v rozmezí 2 % až 15 % s optimem $8\% \pm 2\%$. Rozpuštění se urychluje mícháním. Po rozpuštění se albuminový roztok vyčeří, například filtrací.

V technologických poměrech jsou výše uvedené podmínky zpravidla zachovány tehdy, když rozpustíme 1 kg albuminové pasty ve 2 000 ml destilované apyrogenní vody o teplotě 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$. Hodnota takto vzniklého albuminového roztoku bývá zpravidla mezi pH 4,0 až 6,0 a koncentrace bílkovin bývá v rozmezí $8\% \pm 2\%$. Takto připravený roztok purifikovaného albuminu se vyčeří například filtrací a nízkomolekulární sloučeniny se z albuminového roztoku odstraní gelovou chromatografií, například na dextranových gelech, pod komerčním označením Sephadex G-25, G-50, na polyakrylových gelech pod označením Biogel P-2, P-4, P-6, na metakrylátových gelech, pod komerčním označením Spheron P-40, nebo na jiných materiálech, jako jsou například domácí vývojové materiály na bázi řetězeného škrobu s epichlorhydrinem nebo na bázi perlové celulózy, s vylučovací mezi gelu, vyjádřenou molekulovou hmotností nízkomolekulárních sloučenin do 10 000, přičemž uvedené materiály je nutno používat v optimálním zrnění, zaručujícím průtok pro technologické podmínky.

Nabobtnalý gel, promytý apyrogenní vodou, před tím předdestilovanou o teplotě 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$ se plní do kolony. Za optimální rozměry technologických gelově-chromatografických kolon se považují takové, kde průměr kruhové, nebo uhlopříčka čtvercové nebo obdélníkové základní plochy kolony k výšce kolony se pohybuje v poměru 1:5 až 1:10.

Do kolony necháme nasávat albuminový roztok takovou rychlostí, aby průtok spodní plochou kolony se pohyboval mezi 0,01 ml až 3,0 ml za minutu na plochu 1 cm^2 . Množství albuminového roztoku, nasazeného na kolonu nemá překročit 25 % až 30 % objemu gelové části chromatografické kolony.

Po nasazení celého objemu albuminového roztoku se chromatografická kolona promývá s destilovanou apyrogenní vodou anebo s roztokem chloridu sodného v destilované apyrogenní vodě o koncentraci až 0,9 %, s optimem jen s destilovanou apyrogenní vodou o teplotě 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$ při zachování stejné průtokové rychlosti.

Po výtoku albuminového roztoku, zbaveného nízkomolekulárních sloučenin se gelově chromatografická kolona promývá rychlostí cca 0,3 ml až 0,6 ml za minutu na cm^2 minimálně 10ti násobkem objemu své gelové části s 1M roztokem chloridu sodného v apyrogenní destilované vodě. Potom se chromatografická kolona promyje minimálně 15ti násobkem objemu své gelové části s apyrogenní destilovanou vodou o teplotě 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$, při čemž lze oddělování nízkomolekulárních sloučenin z albuminového roztoku opakovat.

V případě, že bychom prováděli odsolování vzhledem až k 0,9 %nímu roztoku chloridu sodného v apyrogenní vodě, ekvilibrizujeme chromatografickou kolonu po promytí s destilovanou vodou s 10tinásobkem objemu gelové části se zvolenou koncentrací chloridu sodného a potom lze dělení nízkomolekulárních sloučenin opakovat.

202 181

Albuminový roztok po eluci z gelové chromatografické kolony se podrobí sterilizaci, například filtrací nebo radiační sterilizaci a potom dalšímu zpracování, například lyofilizaci nebo zakoncentrování pomocí vakuové destilace, popřípadě pomocí membrán.

Numerické hodnoty, uváděné jako optima, jsou vhodné pro technologické provedení, které bylo úspěšně odzkoušeno.

Příklad 2

Výchozí surovinou může být bílkovinná pasta albuminu, izolovaná i pomocí siranu amonného, polymetafosfátu, trichloroctové kyseliny, kaprylátu, acetonu, éteru, etanolu spolu s Zn^{++} a Ba^{++} , anebo jenom pomocí Zn^{++} . Bílkovinná pasta se zpracovává v dalším postupu jako v příkladě 1.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob odstraňování nízkomolekulárních sloučenin z roztoku krevního albuminu, vyznačující se tím, že bílkovinný materiál, obsahující purifikovaný albumin, se suspenduje za aseptických podmínek v takovém množství apyrogenní vody předtím destilované o teplotě 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$, aby hodnota koncentrace bílkovin se nacházela v rozmezí 2 % až 15 %, albuminový roztok se vyčechá například filtrací a separace nízkomolekulárních sloučenin z albuminového roztoku se provádí eluční gelovou chromatografií s vylučovací mezí gelu, vyjádřenou molekulovou hmotností nízkomolekulárních sloučenin do 10 000, pomocí eluce s destilovanou apyrogenní vodou nebo s roztokem chloridu sodného v destilované apyrogenní vodě o koncentraci až 0,9 %, o teplotě 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$ s hodnotou pH v rozmezí 4,0 až 6,0 při průtoku 0,01 ml až 3,0 ml za minutu na cm^2 výtokové gelové části kolony, přičemž z gelové chromatografické kolony vytekly albuminový roztok se podrobí sterilizaci, například filtrací nebo radiační sterilizaci a potom dalšímu zpracování, například lyofilizaci nebo zakoncentrování pomocí vakuové destilace nebo pomocí membrán.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že výchozí bílkovinný materiál se suspenduje na hodnotu koncentrace bílkovin v rozsahu 6 až 10 %.