



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

203286
(11) (B1)

(22) Přihlášeno 16 11 77
(21) (PV 7536-77)

(40) Zveřejněno 30 06 80

(45) Vydáno 15 12 82

[51] Int. Cl.³
A 61 K 39/395 //
A 61 K 31/415

[75]

Autor vynálezu

ŠTĚPÁNEK IVAN ing. CSc., ŠARIŠSKÉ MICHALANY,
JEŽEK LADISLAV MUDr., MRÁZOVÁ EDITA RNDr., BRATISLAVA a
STACHY ALFRĚD MUDr., PREŠOV

[54] Způsob přípravy gama-globulinového roztoku s definovaným obsahem histaminu

1

Léčba bronchiální astmy a respiračních alergóz se v poslední době zaměřuje na vývoj nových terapeutických preparátů a postupů. Jednou z nových vývojových linií je příprava gama-globulinového preparátu s definovaným obsahem histaminu.

Poznání, že jednou z příčin objevení se alergických příznaků u lidí je uvolnění histaminu, způsobilo zaměření pozornosti na pokus o terapeutické využití této skutečnosti.

Základní podmínkou pro klinickou efektivnost preparátu tohoto druhu je přesná a v úzkém koncentračním rozsahu definovaná koncentrace histaminu, která nesmí být tak vysoká, aby vyvolala alergické příznaky, ale ne tak nízká, aby nedokázala lidský organismus podnítit k nácviку metabolického odbourání volného histaminu.

Průmyslová příprava gama-globulinu se provádí v celosvětovém měřítku převážně pomocí etanolové frakcionace lidské nativní plasy nebo retroplacentárního séra [Cohn E. J., Gurd F. N. R., Surgenor D. M., Barnes B. A., Brown R. K., Derouaux G., Gillespie J. M., Kahnt F. W., Lever W. F., Liu C. H., Mittelman D., Mouton H. F., Gostling G. L., Alberty R. A., Williams J. W.: J. Biol. Chem. 164, 109, 1946; Oncley J. L., Melin M., Rickert D. A., Cameron J. W., Gross P. M.:

2

J. Am. Chem. Soc. 71, 541, 1949; Nitschman H. S., Kistler P., Lergier W.: Helv. Chim. Acta 37, 866, 1954; Kistler P., Nitschman H. S.: Vox Sang. 7, 414, 1962; Taylor H. L., Bloom F. C., McCall K. B., Hyndman L. A., Anderson H. D.: J. Am. Chem. Soc. 78, 1356, 1956).

Technologický proces je zpravidla prováděn za aseptických podmínek a do doby konečného zpracování je izolovaný gama-globulin převážně přechováván ve formě lyofilizovaného preparátu.

Technologický postup může část některých nízkomolekulárních sloučenin s biochemicko-fyziologickou aktivitou v roztoku gama-globulinu, jako je například histamin, koncentrovat, tj. obohacovat vzhledem k jejich koncentraci ve výchozí surovině, z které byl gama-globulin izolován.

Z aspektu přípravy gama-globulinových roztoků s definovaným obsahem histaminu je závažnou skutečností výskyt proměnlivého obsahu histaminu vázaného na molekulu gama-globulinu u zdravé nealergické populace [Laborde C., Parrot J. L., Sandor G.: C. R. Acad. Sci. Paris (248, 3060, 1959; Parrot J. L., Laborde-Burtin C., Saindelle A.: Ann. Allergy 22, 511, 1964).

Až dosud se gama-globulin s definovaným obsahem histaminu připravoval tím způsobem, že se gama-globulinový roztok požado-

vané koncentrace smíchal s histaminovým roztokem a takto vzniklá směs se sterilizovala filtrací přes azbestocelulózový filtr, sterilně se rozplnila a zlyofilizovala. Příčinou těžkostí je chemisorpce stopových množství histaminu na filtrační vložku, což má za následek nehomogenní snížení koncentrace histaminu v hotovém preparátu v dané výrobní šarži.

Hodnota koncentrace histaminu ve 2 ml $0,6 \pm 0,1\%$ roztoku gama-globulinu se má pohybovat v rozmezí 0,15 až 0,18 mikrogramu. Nedostatkem dosud užívané technologie je skutečnost, že požadované hodnoty koncentrace histaminu nedosáhne v každém případě, což lze dokumentovat údajem, že z 20 připravených šarží pouze 25 % dosáhlo požadované hodnoty koncentrace, přičemž průměrná hodnota koncentrace histaminu byla ve 2 ml gama-globulinu 0,091 mikrogramu místo požadovaného rozsahu 0,15 až 0,18 mikrogramu.

U nově navrhované technologie se tyto potíže nevyskytovaly a z 10 připravených šarží, podle vynálezu, každá dosáhla požadovaného koncentračního rozsahu, přičemž průměrná hodnota koncentrace histaminu byla ve 2 ml gama-globulinového roztoku 0,166 mikrogramu.

Podstata způsobu přípravy gama-globulinového roztoku s definovaným obsahem histaminu spočívá podle vynálezu v tom, že se stanoví proměnlivý, od šarže k šarži se měnící obsah histaminu v gama-globulinovém roztoku, který se připraví z lyofilizovaného preparátu tak, že se lyofilizovaný bílkovinný materiál obsahující purifikovaný gama-globulin rozpouští v 0,1 až 3,0% roztoku chloridu sodného v destilované apyrogenní vodě, s optimem 0,45 až 0,9 % chloridu sodného, o teplotě 0°C až $+6^\circ\text{C}$, s optimem $3,0^\circ\text{C}$, s hodnotou pH 6,4 až 7,4, s optimem $6,95 \pm 0,05$, na hodnotu koncentrace 1 až 17 % bílkovin, s optimem 6 % bílkovin, přičemž takto připravený gama-globulinový roztok se sterilizuje filtrací, otestuje se na obsah histaminu a naředí se za sterilních podmínek sterilním roztokem histaminu v izotonickém roztoku, který byl sterilizován autoklávováním, například v 0,9-procentním roztoku chloridu sodného na požadovanou koncentraci gama-globulinu, například 0,5 až 0,7 % bílkovin, a histaminu například 0,075 až 0,09 mikrogramu na ml, nebo se takové naředění provádí za nesterilních podmínek a vzniklý směsný roztok o požadovaných parametrech se dodatečně sterilizuje, například pomocí radioaktivního záření, rozplňuje se a potom se podrobí dalšímu zpracování, například lyofilizaci.

Vynález je dále objasněn na příkladech provedení, jimiž jeho rozsah není ani omezen, ani vyčerpán.

Příklad 1

Výchozí surovinou je lyofilizovaný gama-

-globulin, izolovaný metodou podle Cohna. Bílkovinný lyofilizovaný materiál se rozpouští v 0,1 až 3,0% roztoku chloridu sodného v destilované apyrogenní vodě s optimem 0,45 až 0,9 % chloridu sodného, o teplotě 0°C až 6°C , s optimem 3°C , s hodnotou pH 6,4 až 7,4, s optimem $6,95 \pm 0,05$, na hodnotu koncentrace 1 % až 17 % bílkovin, s optimem 6 % bílkovin, přičemž takto připravený gama-globulinový roztok se sterilizuje, například filtrací, otestuje se na obsah histaminu, například Gadumovou modifikací [Gadum J. H.: J. Physiol. 8, 467, 1949] Magnusonové metody [Magnus R.: Plüg Arch. 102, 123, 1904].

Pro zjištění obsahu histaminu ve sterilním gama-globulinovém roztoku se připraví sterilní roztok histaminu, který byl sterilizován autoklávováním, například v 0,9% roztoku chloridu sodného v destilované apyrogenní vodě o takové koncentraci, aby po naředění gama-globulinu za sterilních podmínek tímto způsobem vznikl sterilní roztok o požadovaných parametrech terapeutického preparátu. V současnosti se požaduje koncentrace histaminu v rozmezí 0,15 až 0,18 mikrogramu na 2 ml 0,5 až 0,7% gama-globulinu. Naředění je možné provést i za nesterilních podmínek a vzniklý směsný roztok o požadovaných parametrech se dodatečně sterilizuje, například pomocí radioaktivního záření.

Sterilní roztok gama-globulinu s požadovaným obsahem histaminu se rozplňuje a potom se podrobí dalšímu zpracování, například lyofilizaci.

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

Příklad 2

Výchozí surovinou může být lyofilizovaný gama-globulin, izolovaný pomocí síranu amonného a hydroxidu hlinitého [Schultze H. E., Matheka H. D., Behringwerke Mitt. 28, 9, 1954; Schultze H. E., Schönenberger M., Matheka H. D.: Behringwerke Mitt. 26, 21, 1952], rivanolu [Hořejší J., Smetana R.: Acta med. Scand. 155, 65, 1956], síranu sodného [Amiraian K., Leikhim E. J.: J. Immunol. 87, 301, 1961], chloridu hlinitého [Lewin J.: Therapie 9, 523, 1954], DEAE celulózy [Sober H. A., Peterson E. A.: Fed Proc 17, 1116, 1958; Peterson E. A., Sober H. A.: J. Am. Chem. Soc. 78, 756, 1956], kyseliny kaprylové [Steinbuch M., Audran R.: Franc. D'étud. Clin. Biol. 14, 1054, 1969], iontů Zn^{++} a Al^{+++} [Rejnek J., Škvařil F.: Coll. Czechoslov. Chem. Commun. 22, 1489, 1957; Rejnek J., Škvařil F.: Coll. Czechoslov. Chem. Commun. 23, 773, 1958], polymetafosfátu [Nitschman H. S., Rickli R., Kistler P.: Vox Sang. 5, 232, 1960], anebo éteru [Pennell R. B. v Putnam F. W. (ed) The Plasma Proteins vol I Academic Press-New York 1960 str. 9]. Bílkovinný materiál se zpracovává v dalším postupu jako v příkladu č. 1.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob přípravy gama-globulinového roztoku s definovaným obsahem histaminu, vyznačující se tím, že lyofylizovaný bílkovinný materiál obsahující purifikovaný gama-globulin se rozpouští v 0,1 až 3,0% roztoku chloridu sodného v destilované apyrogenní vodě o teplotě 0 °C až +6 °C, s hodnotou pH v rozmezí 6,4 až 7,4 na hodnotu koncentrace 1 % až 17 % bílkovin, přičemž takto připravený gama-globulinový roztok se sterilizuje filtrací, otestuje se na obsah histaminu a naředí se za sterilních podmínek sterilním roztokem histaminu v izotonickém roztoku na požadovanou koncentraci gama-globulinu a histaminu nebo se takové naředění provádí za nesterilních podmínek a vzniklý směsný roztok o požadovaných parametrech se dodatečně sterilizuje, například radiační sterilizací, rozplňuje

se a potom se podrobí dalšímu zpracování, s výhodou lyofilizací.

2. Způsob přípravy podle bodu 1, vyznačující se tím, že bílkovinný materiál se rozpouští v 0,45 až 0,9% roztoku chloridu sodného v destilované apyrogenní vodě s hodnotou pH 6,90 až 7,00 v takovém množství, aby koncentrace gama-globulinu byla 6 % bílkovin.

3. Způsob přípravy podle bodů 1 a 2, vyznačující se tím, že se gama-globulinový roztok naředí za sterilních podmínek sterilním roztokem histaminu v izotonickém roztoku tak, aby výsledná koncentrace gama-globulinu byla v rozmezí 0,5 % až 0,7 % bílkovin a výsledná koncentrace histaminu v rozmezí 0,075 až 0,09 mikrogramu histaminu na 1 ml směsného roztoku.