



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

204168

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 16 11 77  
(21) (PV 7535-77)

(40) Zveřejněno 31 07 80

(45) Vydáno 15 12 83

(51) Int. Cl.<sup>3</sup>  
A 61 K 35/16

(75)

Autor vynálezu

ŠTĚPÁNEK IVAN ing. CSc., ŠARIŠSKÉ MICHALANY, STACHY  
ALFRĚD MUDr., BARLA IVAN ing. a BANDA IMRICH ing., PREŠOV

## (54) Způsob odstraňování vysokomolekulárních látek blokuujících účinek komplementu z krevní plasmy

1

Vynález řeší způsob odstraňování vysokomolekulárních látek blokuujících účinek komplementu, které se vyskytují v gama globulinové frakci krevní plasmy izolované etanolem a jsou zodpovědné za část její antikomplementární aktivity. Umožňuje připravit gama globulin se sníženou antikomplementární aktivitou, použitelný pro terapeutické účely.

S poznáním skutečnosti, že v gama globulinové frakci krevních bílkovin se soustřeďuje protilátková aktivita způsobilo, že izolovaný gama globulin upravený do formy injekčního roztoku pro i. m. aplikaci se stal jedním z nejčastěji užívaných preparátů vyrobených z lidské krevní plasmy.

Základní podmínkou pro klinické použití preparátu na bázi i. v. gama globulinu je technicky zvládnutá izolace gama globulinu ze směsi krevních bílkovin s malou koncentrací látek blokuujících účinek komplementu bez ohledu na mechanismus účinku. Dosud vyráběný gama globulin pro i. m. aplikaci podmínkám pro i. v. aplikaci nevyhovuje, protože obsahuje jednak látky s hypotenzivním účinkem a jednak proměnlivý, ale značně vysoký obsah látek blokuujících účinek komplementu tj. látky s antikomplementární aktivitou.

Při studiu mechanismu účinku antikom-

2

plementární aktivity u lidského gama globulinu na morčecí komplement bylo zjištěno, že antikomplementární aktivita gama globulinu významně snižuje koncentraci C'1 a C'4 složek komplementu u morčecího séra (Marcus M. D.: J. Immunology 84, 273, 1960).

Výsledky provedených pokusů Waldesbuhla a spol., Malgrasa a spol. a Christiana svědčí o tom, že jednou z příčin vzniku antikomplementární aktivity u lidského gama globulinu jsou agregované molekuly gama globulinu (Waldesbuhl M., Allan R., Meylan A., Isliker H.: Immunochemistry 7, 185, 1970; Malgras J., Haupman G., Zorn J. J., Waitz R.: Rev. Franc. Transf. 13, 173, 1970; Christian C. L.: J. Immunol. 84, 117, 1960; Christian C. L.: J. Immunol. 84, 112, 1960). Podle názoru Siegela a Lüschera jsou za antikomplementární aktivitu gama globulinu zodpovědné vysokomolekulární látky alfa-globulinové povahy (Siegel A., Lüscher E. F.: Vox Sang. 14, 348, 1968).

Nedostatkem dosud nejužívanější celosvětové technologie je skutečnost, že gama globulin se v současnosti izoluje převážně pomocí Cohnovy metody (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 R. F., Schmid K., Uroma E.: J. Amer. Chem. Soc. 72, 465, 1950), která získává gama globulin tj. frakci II pomocí extrakce z komplexu frakcí I + II + III, která umožňuje přechod vysokomolekulárních látek alfa globulinové povahy z frakce I jakož i agregátů gama globulinů z precipitátu frakcí I + III do gama globulinového roztoku a dále potom do gama globulinového precipitátu po srážení gama globulinové pasty například etanolem.

Nově navrhovaná technologie, podle předloženého vynálezu, využívá skutečnost, že agregáty gama globulinu a vysokomolekulárních látek alfa globulinové povahy se strhávají při srážení fibrinogenu etanolem do fibrinogenového precipitátu a jsou spolu s ním oddělovány z roztoku. Čím úplnější je oddělování fibrinogenu z plasmy před precipitací gama globulinu, tím menší je obsah látek s antikomplementární aktivitou ve vyprecipitovaném gama globulinu. Tuto skutečnost lze dokumentovat údajem, že z 5 připravených experimentálních šarží, podle předloženého vynálezu, bylo dosaženo snížení antikomplementární aktivity u lyofilizovaného preparátu o  $25 \pm 5\%$  ve srovnání s tímtož gama globulinem, který byl získán z téhož výchozího materiálu bez předcházejícího etapovitého oddělování fibrinogenu tj. jenom pomocí extrakce z frakce I + II + III. Do první části fibrinogenového precipitátu se strhává cca  $16 \pm 2\%$ , do druhé části cca  $6 \pm 2\%$  a do třetí části cca  $3 \pm 1\%$  z celkové antikomplementární aktivity gama globulinu.

Podstata odstraňování vysokomolekulárních látek blokujičích účinek komplementu z krevní plasmy spočívá podle předloženého vynálezu v tom, že tyto látky se při srážení fibrinogenu etanolem strhávají do fibrinogenového precipitátu, z kterého první část je precipitována při  $8 \pm 1$  obj. % etanolu z celkového objemu reakční směsi, teplotě  $-2,5^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ , pH  $7,0 \pm 0,2$  a po následné separaci, například centrifugací, je druhá část fibrinogenového obsahu precipitována ze supernatantu při  $8 \pm 1$  obj. % etanolu z celkového objemu reakční směsi etanolem, teplotě  $-2,5^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ , pH  $5,35 \pm 0,1$  a po následné separaci, například centrifugací je třetí část fibrinogenového obsahu precipitována při  $19 \pm 2$  obj. % etanolu z celkového objemu reakční směsi při pH  $5,85 \pm 0,1$ , teplotě  $-5^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  a po následné separaci například centrifugací je takto získaná bílkovinná pasta suspendována na  $1,3 \pm 0,5\%$  roztok bílkovin v destilované apyrogenní vodě o teplotě  $0^\circ\text{C}$  až  $+1^\circ\text{C}$  o iontové síle  $0,018 \pm 0,004$ , například od chloridu sodného, přičemž část bílkovin, obsahujících fibrinogen je precipitována při  $10 \pm 2$  obj. % etanolu z celkového objemu reakční směsi při teplotě  $-2,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$  a po následné separaci třetí části, například centrifugací, se supernatant obsahující převážně ga-

ma globulin podrobí dalšímu zpracování například srážení pomocí etanolu, uvedení gama globulinové pasty do roztoku, odstraňování nízkomolekulárních sloučenin například gelovou filtrací, sterilizaci například filtrací a lyofilizací nebo zakoncentrování pomocí membrán.

Vynález je dále objasněn na příkladu provedení jímž jeho rozsah není ani omezen ani vyčerpán.

#### Příklad

Odstraňování vysokomolekulárních látek blokujičích účinek komplementu se provádí tím způsobem, že tyto vysokomolekulární látky s antikomplementární aktivitou se spolu srážejí s fibrinogenem pomocí etanolu. Precipitace fibrinogenu pomocí etanolu neprobíhá však kvantitativně a z toho důvodu je potřeba provádět tuto precipitaci třístupňově.

Precipitace první části fibrinogenu se provádí z plasmy pomocí  $8 \pm 1$  obj. % etanolu z celkového objemu reakční směsi při konečné teplotě  $-2,5^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$  při pH  $7,0 \pm 0,2$ . Hlavní podíl fibrinogenu je vysrážen v podobě jemné suspenze, která je separována například centrifugací a ze získaného supernatantu se provede precipitace druhé části fibrinogenového obsahu.

Precipitace druhé části fibrinogenu se provádí ze supernatantu pomocí  $8 \pm 1$  obj. procento etanolu z celkového objemu reakční směsi při konečné teplotě  $-2,5^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$  Celsia, pH  $5,35 \pm 0,1$ . Fibrinogen je v tomto případě srážen už jako balastní bílkovina spolu s jinými bílkovinami v podobě suspenze, která je separována, například centrifugací, a ze získaného supernatantu se provede precipitace třetí části fibrinogenového obsahu.

Precipitace třetí části fibrinogenu se provádí ze supernatantu pomocí  $19 \pm 2$  obj. % etanolu z celkového objemu reakční směsi při pH  $5,85 \pm 0,1$ , teplotě  $-5^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  přičemž po následné separaci vyprecipitovaných bílkovin se bílkovinná pasta suspenduje na  $1,3 \pm 0,5\%$  roztok bílkovin v destilované apyrogenní vodě o teplotě  $0^\circ\text{C}$  až  $+1^\circ\text{C}$  Celsia a iontové síle  $0,018 \pm 0,004$ , například od chloridu sodného. Z takto připraveného bílkovinného roztoku se pomocí  $10 \pm 2$  obj. procenta etanolu z celkového objemu reakční směsi při teplotě  $-2,5^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$  je vyprecipitován fibrinogen jako balastní bílkovina ve směsi s jinými bílkovinami. Po následné separaci třetí části fibrinogenu v podobě bílkovinné pasty, například centrifugací, se v supernatantu nachází převážně roztok gama globulinu, který se podrobí dalšímu zpracování například srážení pomocí etanolu, uvedení gama globulinové pasty do roztoku, odstraňování nízkomolekulárních sloučenin, například gelovou filt-

rací, sterilizací, například filtrací a lyofilizací nebo zakoncentrování pomocí membrán.

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

#### P R E D M Ě T V Y N Ā L Ě Z U

Způsob odstraňování vysokomolekulárních látek blokuujících účinek komplementu z krevní plasmy, vyznačující se tím, že vysokomolekulární látky se srážejí s fibrinogenem z krevní plasmy etanolem do fibrinogenového precipitátu ve třech stupních, přičemž první část je precipitována při  $8 \pm 1$  obj. % etanolu z celkového objemu reakční směsi, teplotě  $-2,5^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ , pH 7,0  $\pm 0,2$  a po následné separaci, například centrifugací, je druhá část fibrinogenového obsahu precipitována ze supernatantu při  $8 \pm 1$  obj. % etanolu z celkového objemu reakční směsi etanolem, teplotě  $-2,5^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$  Celsia, pH 5,35  $\pm 0,1$  a po následné separaci, například centrifugací je třetí část fibrinogenového obsahu precipitována při  $19 \pm 2$  obj. % etanolu z celkového objemu reakční směsi při pH 5,85  $\pm 0,1$ , teplotě  $-5^\circ\text{C}$

$\pm 1^\circ\text{C}$  a po následné separaci, například centrifugací, je takto získaná bílkovinná pasta suspendována na  $1,3 \pm 0,5\%$  roztok bílkovin v destilované apyrogenní vodě o teplotě  $0^\circ\text{C}$  až  $+1^\circ\text{C}$  a iontové síle  $0,018 \pm 0,004$  přičemž část bílkovin obsahujících fibrinogen je precipitována při  $10 \pm 2$  obj. proc. etanolu z celkového objemu reakční směsi při teplotě  $-2,5^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$  a po následné separaci třetí části, například centrifugací, se supernatant, obsahující převážně gama globulin, podrobí dalšímu zpracování, například srážení pomocí etanolu, uvedení gama globulinové pasty do roztoku, odstraňování nízkomolekulárních sloučenin, například gelovou filtrací, sterilizací, například filtrací a lyofilizací nebo zakoncentrování pomocí membrán.