



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

223 511

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlášené 18 12 81

(21) PV 9479-81

(51) Int. Cl. A 61 K 39/395

(40) Zverejnené 30 11 82

(45) Vydané 01 05 84

(75)

Autor vynálezu **BULÍK JOSEF ing.CSc., PREŠOV**

(54) Spôsob získavania ľudského gamaglobulínu z odpadnej frakcie vznikajúcej pri depyrogenizácii injekčného roztoku

Vynález možno využiť v imunologic-ko-biologickej výrobe liečebných prípravkov. Účelom vynálezu je zvýšenie výťažnosti ľudského gamaglobulínu pripravovaného z ľudskej plazmy, využitím odpadnej frakcie vznikajúcej pri depyrogenizácii injekčného roztoku. Zvýšenie účinku, najmä výťažnosti ľudského gamaglobulínu sa dosahuje tým, že z odpadnej frakcie vznikajúcej pri depyrogenizácii injekčného roztoku sa pri pH 5,5 až 5,8 iónovej sile 0,001 až 0,01 až 6,0 hmotnostných % bielkovín extrahuje gamaglobulín.

223 511

Vynález sa týka spôsobu extrakcie ľudského gamaglobulínu z odpadnej frakcie vznikajúcej pri depyrogenizácii injekčného roztoku a to tým spôsobom, že pri vhodnej koncentrácii bielkovín, pH, iónovej sily a teploty gamaglobulín prechádza do roztoku a od nebielkovinného podielu je separovaný centrifugáciou. V ďalšej fáze koncentrácia iónov vápnika a fosforu sa znižuje dialýzou.

Najznámejšie izolačné postupy ľudského gamaglobulínu sú:

Vysolovanie pomocou soli /Howe P.E.: *Physiol. Revs.* 5, 439, 1925, Edsall J.T.: *Advances in Protein Chem.* III, 383-479, 1947, Nitschmann H.: *Vox Sang.*, 6, 2, 244, 1961/.

Frakcionácia etanolom /Cohn E.J., Strong L.E., Hughes W.L., Mulford D.J., Ashworth J., Melin M., Taylor H.L.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 68, 459, 1946/ a jej modifikácia /Nitschmann H., Kistler P., Lergie W.: *Helv. Chim. Acta*, 37, 866, 1954, Hořejší J.: *Čas. lek. českých*, 39, 1067, 1953/.

Frakcionácia rivanolom /Rejnek J., Bednářik T., Mašek J.: *Čsl. farm.*, 10, 407, 1961, Hořejší J., Smětana R.: *Chem. listy*, 48, 758, 1954, Škvařil F.: *Čsl. farmácia*, 9, 522. 1957, Salfer A., Lipkin L.E.: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 102, 1, 220-222, 1959, Steinbuch M.: *Vox. Sanguinis* 23, 92-106, 1972/.

Frakcionácia kovmi /Cohn E.J. et.al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 465-474, 1950, Rejnek J., Škvařil F.: *Chem. listy*, 51, 6, 1190-1193, 1957/.

Frakcionácia polyethylenglykolom /Falksveden I.: *Patent Švédsko*, 348, 942, 1972, Polson A., Ruiz-Brave C.: *Vox Sanguinis* 23, 107-118, 1972/.

Gélová filtrácia /Fureman P., Vawier W.E., Goodman H.C.: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 115, 4, 845-849, 1969, Friedli H., Fournier E., Volk T., Kistler P.: *Vox Sanguinis*, 33, 2, 93-96, 1977/.

V prípade, že injekčný roztok ľudského gamaglobulínu nevyhovuje kritériam na obsah pyrogenných látok podľa Čsl.3 prevedie sa jeho depyrogenizácia nasledovným spôsobom:

Injekčný roztok ľudského gamaglobulínu sa schladí na teplotu + 2 až + 4 °C a po kvapkách za stáleho miešania pridá sa 10 objemových %, 15 % roztoku normálneho fosforečnanu sodného a 5 objemových %, 18 % roztoku octanu vápenatého.

Po vytvorení gélu zmes sa ponechá pri teplote + 2 až + 4 °C po dobu 24 hodín, potom sa gél odstraní centrifugáciou. Odpadná frakcia predstavuje nerozpustný fosforečnan vápenatý, ktorý na seba viaže určité množstvo gamaglobulínu. Táto frakcia vznikajúca pri depyrogenizácii injekčného roztoku ľudského gamaglobulínu doteraz nebola využívaná a predstavuje odpad.

Na získanie gamaglobulínu z tejto frakcie bol vypracovaný technologický postup, kde extrakciou pri vhodnej koncentrácii bielkovín, pH a iónovej sily sa získava vyhovujúci gamaglobulín. Navrhovaný technologický postup extrakcie ľudského gamaglobulínu z odpadnej frakcie vznikajúcej pri depyrogenizácii ľudského gamaglobulínu prispieva k ďalšiemu zhodnocovaniu východzej suroviny ľudskej plazmy a uspokojovaniu zdravotníckeho terénu žiadaným prípravkom.

Podstata extrakcie ľudského gamaglobulínu z odpadnej frakcie vznikajúcej pri depyrogenizácii injekčného roztoku spočíva v tom, že táto sa suspenduje v apyrogennej vode na 2,0 až 6,0 hmotnostných % bielkovín, iónovej sily 0,001 až 0,01, pH 5,5 až 5,8 pri teplote + 4 °C. Miešaním po dobu 3 až 5 hodín gamaglobulín prejde do roztoku a nerozpustné balastné podiely sa separujú centrifugáciou. Získaný supernatant sa filtruje cez čeriace vložky a filtrát sa dialyzuje oproti 0,35 - 0,85 % - roztoku chloridu sodného pri teplote + 4 °C po dobu 8 až 48 hodín. Dialyzát sa rozplňuje do NTS fliaš, namrazuje, lyofilizuje a farmaceuticky spracúva na injekčný roztok gamaglobulínu.

Príklad č. 1

1000 g odpadnej frakcie vznikajúcej pri depyrogenizácii gamaglobulínu sa suspenduje v 2000 ml apyrogennej vody. Po dvojhodinovom miešaní prevedie sa kontrola hodnoty pH a pridaním 35 ml 1 M CH_3COOH upraví sa na hodnotu 5,5. Roztok sa potom ešte mieša 3 až 4 hodiny pri teplote + 1 až + 4 °C, potom sa centrifuguje na chladenej vysokoobratkovej centrifuge. Získaný supernatant sa filtruje cez čeriace vložky a filtrát sa potom

dialyzuje oproti 0,35 % roztoku chloridu sodného po dobu 18 hodín pri teplote + 1 až + 4 °C. Konečná koncentrácia fosforu v dialyzovanom roztoku má sa znížiť pod hranicu 4 mg % a vápnika pod hranicu 3,5 mg %. Dialyzát sa rozplňuje do NTS fliaš, namrazuje, lyofilizuje. Lyofilizovaný gamaglobulín sa rozpúšťa a farmaceuticky spracúva.

Príklad č. 2

1000 g odpadnej frakcie vznikajúcej pri depyrogenizácii gamaglobulínu sa suspenduje v 4000 ml apyrogennej vody. Po dvojhodinovom miešaní sa prevedie kontrola hodnoty pH roztoku a prídáním 50 ml 1 M CH_3COOH upraví sa na hodnotu 5,6. Roztok sa potom ešte mieša 3 až 4 hodiny pri teplote + 1 až + 4 °C, počom sa centrifuguje na ochladenej vysokoobratkovej centrifuge. Získaný supernatant sa filtruje cez čeriace vložky a filtrát sa potom dialyzuje oproti 0,45 % roztoku chloridu sodného po dobu 40 hodín pri teplote + 1 až + 4 °C. Konečná koncentrácia fosforu v dialyzovanom roztoku má sa znížiť pod hranicu 2 mg % a vápnika pod hranicu 1,75 mg %. Dialyzát sa rozplňuje do NTS fliaš, namrazuje a lyofilizuje. Lyofilizovaný gamaglobulín sa rozpúšťa a farmaceuticky spracúva.

Výťažnosť

Výťažnosť takto získaného 16 % injekčného roztoku gamaglobulínu sa v priemere pohybuje okolo 900 ml z 1000 g odpadnej frakcie.

Analytické hodnotenie:

Požadované skúšky	Kritéria ČSN 86 3131	Dosiahnuté výsledky
Sterilita	sterilné	vyhovuje
Neškodnosť	neškodné	vyhovuje
Obsah pyrogénnych látok	apyrogénne	vyhovuje
Obsah bielkovín	14,5-17,5 g/100 ml	14,81 g/100 ml
Obsah stabilizátora	1,5-3,0 g/100 ml	1,88 g/100 ml
Obsah tiomersálu	max. 0,01 g/100 ml	0,0088 g/100 ml
Obsah NaCl	0,5-0,9 %	0,76 %
pH	6,2-7,2	6,93
Elektroforetická čistota	min. 90 %	94,4 %

Požadované skúšky	Kritéria výrobného predpisu doplnok 1	Dosiahnuté výsledky
Obsah vápnika	max. 11,5 mg %	10,5 mg %
Obsah fosforu	max. 12,0 mg %	12,0 mg %

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

223 511

1. Spôsob získavania gamaglobulínu z odpadnej frakcie vznikajúcej pri depyrogenizácii injekčného roztoku ľudského gamaglobulínu vyznačujúci sa tým, že odpadná frakcia sa suspenduje v apyrogennej vode pri teplote $+1$ až $+4$ °C na koncentráciu 2,0 až 6,0 hmotnostných % bielkovín, ^{pH} 5,5 až 5,8, iónovej sile 0,001 až 0,01 a koncentrácia iónov vápnika a fosforu sa znižuje dialýzou oproti 0,35 až 0,85 % roztoku chloridu sodného.
2. Spôsob prípravy podľa bodu 1 vyznačujúci sa tým, že dialýza získaného roztoku gamaglobulínu prevádza sa pri teplote $+1$ až $+4$ °C po dobu 8 až 48 hodín.