



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

203287
(11) (B1)

[22] Přihlášeno 16 11 77
[21] (PV 7537-77)

(51) Int. Cl.³
A 61 K 39/395 //
A 61 K 31/415

[40] Zveřejněno 30 06 80

[45] Vydáno 15 12 82

(75)

Autor vynálezu

ŠTĚPÁNEK IVAN ing. CSc., ŠARIŠSKÉ MICHALANY,
JEŽEK LADISLAV MUDr., MRÁZOVÁ EDITA RNDr., BRATISLAVA,
STACHY ALFRĚD MUDr. a BANDA IMRICH ing., 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 nácviu metabolického odbourání volného histaminu.

Průmyslová příprava gama-globulinu se provádí v celosvětovém měřítku převážně pomocí etanolové frakcionace lidské nativní plasmy 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 bílkovinné pasty při nízkých teplotách.

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

Z aspektu přípravy gama-globulinového roztoku 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 (243, 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

požadované koncentrace smíchal s histaminovým roztokem a takto vzniklá směs se sterilizovala filtrací přes azbestocelulózový filtr, sterilně se rozpínala a zlyofilizovala. Příčinou těžkosti je chemisorpce stopových množství histaminu na filtrační vložku, což má za následek nehomogenní snížení koncentrace 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-globulinového roztoku 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 v 2 ml směsného roztoku s gama-globulinem 0,169 mikrogramu.

Podstata způsobu přípravy gama-globulinového roztoku s definovaným obsahem histaminu je podle vynálezu v tom, že bílkovinný materiál obsahující purifikovaný gama-globulin suspenduje za aseptických podmínek v takovém množství apyrogenní destilované vody o teplotě 0°C až $+6^\circ\text{C}$, aby hodnota koncentrace bílkovin byla v rozmezí 2 % až 15 %, s optimem 7 % $\pm$ 1 %, gama-globulinový roztok se vyčeří filtrací a separace od šarží k šarži měnící se koncentrace histaminu z gama-globulinového roztoku se provádí pomocí eluční chromatografie, s vylučovací mezí gelu, vyjádřenou molekulovou hmotností nízkomolekulárních sloučenin, do 10 000 pomocí eluce s 0,1% až 3,0% roztokem 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 hodnotou pH v rozmezí 6,4 až 7,4, s optimem $6,95 \pm 0,05$, při průtoku 0,01 ml až 3,0 ml, s optimem 0,05 ml až 1,0 ml, za minutu na cm^2 výtokové plochy gelové části, přičemž z gelové chromatografické kolony vytekly gama-globulinový roztok se buď sterilizuje filtrací a naředí se za sterilních podmínek na žádanou hodnotu koncentrace gama-globulinu, například 0,5 % až 0,7 % bílkovin, se sterilním roztokem histaminu, který byl sterilizován autoklávováním, o známé požadované koncentraci, například 0,075 až 0,09 mikrogramu na 1 ml směsného roztoku, anebo se takové naředění provádí za nesterilních podmínek a vzniklý směsný roztok o požadovaných parametrech se dodatečně sterilizuje radiační sterilizací a podrobí se dalšímu zpracování, například lyofilizací. Vynález je dále

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

Příklad 1

Výchozí surovinou je pasta frakce II, izolovaná podle Cohna. Pasta frakce II se rozpouští v takovém množství destilované apyrogenní vody o teplotě 0°C až $+6^\circ\text{C}$, aby hodnota koncentrace bílkovin byla v rozmezí 2 % až 15 %, s optimem 7 % $\pm$ 1 %. Rozpuštění se urychluje mícháním. Po rozpuštění se gama-globulinový roztok vyčeří, například filtrací.

V technologických poměrech je výše uvedených podmínek zpravidla dosaženo tehdy, když rozpouštíme 1 kg gama-globulinové pasty ve 2000 ml destilované apyrogenní vody o teplotě 0°C až $+6^\circ\text{C}$. Hodnotu pH takto vzniklého gama-globulinového roztoku upravíme na 6,4 až 7,4, s optimem $6,95 \pm 0,05$, například s 0,5 M roztokem hydroxidu sodného v destilované apyrogenní vodě o teplotě 0°C až $+6^\circ\text{C}$.

Takto připravený roztok purifikovaného gama-globulinu se vyčeří, například filtrací, a nízkomolekulární sloučeniny spolu s histaminem se z roztoku odstraní eluční gelovou chromatografií, například na dextranových gelech, pod komerčním označením Sephadex G-25, G-50, na polyakrylamidových gelech, pod komerčním označením Biogel P-2, P-4, P-6, na metakrylátových gelech, pod komerčním označením P-40 Spheron, nebo na jiných materiálech, jako jsou například domácí vývojové materiály na bázi škrobu řetězeného s epichlorhydrinem na bázi perlové celulózy s vylučovací mezí gelu, vyjádřenou molekulovou hmotností nízkomolekulárních sloučenin do 10 000, přičemž uvedené materiály je nutno používat v optimálním zrnění, zaručujícím průtok pro technologické podmínky.

Nabotnalý gel promytý 0,1% až 3,0% roztokem chloridu sodného v destilované apyrogenní vodě, s optimem 0,45 % až 0,9 % chloridu sodného, o teplotě 0°C až $+6^\circ\text{C}$ se plní do chromatografické kolony. Za optimální rozměry technologické gelové chromatografické kolony se považují takové, kde průměr kruhové nebo uhlopříčka čtvercové, popřípadě obdélníkové základní plochy k výšce kolony se pohybují v poměru 1:5 až 1:10.

Do kolony necháme nasávat gama-globulinový roztok takovou rychlostí, aby se průtok spodní plochou kolony pohyboval mezi 0,01 ml až 3,0 ml, s optimem 0,05 ml až 1,0 ml, za minutu na plochu 1 cm^2 . Množství gama-globulinového roztoku nasazené na kolonu nemá překročit 25 % až 30 % objemu gelové části chromatografické kolony.

Po nasazení celého objemu gama-globulinového roztoku se chromatografická kolona promývá 0,1% až 3,0% roztokem chloridu sodného, s optimem 0,45 až 0,9 % chloridu sodného, v destilované apyrogenní vodě o

teplotě 0 °C až +6 °C při zachování stejné průtokové rychlosti jako při nasávání.

Po výtoku gama-globulinového roztoku zba-veného nízkomolekulárních sloučenin se ge-lově chromatografická kolona promývá rych-lostí 0,3 ml až 0,6 ml za minutu na cm² mini-málně 10násobkem objemu své gelové části s 1 M roztokem chloridu sodného v apyro-genní destilované vodě o teplotě 0 °C až +6 °C. Potom se chromatografická kolona promyje minimálně 15násobkem objemu své gelové části s apyrogenní destilovanou vo-dou o teplotě 0 °C až +6 °C, přičemž lze oddělování nízkomolekulárních sloučenin spolu s histaminem z gama-globulinového roztoku na gelově chromatografické koloně po ekvilibrizaci s desetnásobkem objemu gelové části s 0,1% až 3,0% roztokem chlo-ridu sodného v destilované apyrogenní vo-dě, s optimem 0,45 % až 0,9 % chloridu sodného, opakovat.

Gama-globulinový roztok po eluci z gelo-vě chromatografické kolony se zpravidla sterilizuje a naředí se za sterilních podmí-nek na žádanou hodnotu koncentrace gama-globulinu, například 0,5 % až 0,7 % bílko-vin, se sterilním roztokem histaminu, který byl sterilizován autoklávováním, o známé požadované koncentraci, například 0,075 až 0,09 mikrogramu na 1 ml směsného rozto-ku. Lze provést i naředění gama-globulino-vého roztoku bezprostředně po eluci z ko-lony na požadovanou hodnotu gama-globu-linu s nesterilním roztokem histaminu o známé požadované koncentraci a takto vy-tvořená směs se sterilizuje radiační sterilí-

zací, směs se rozplní a podrobí se dalšímu zpracování, například lyofilizaci.

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

Příklad 2

Výchozí surovinou může být bílkovinná pasta gama-globulinu nebo roztok izolova-ný pomocí síranu amonného a hydroxidu hlinitého [Schultze H. E., Matheka H. D.: Behringwerke Mitt. 28, 9, 1954; Schultze H. E., Schönerberger M., Matheka H. D.: Be-hringwerke Mitt. 26, 21, 1952], rivanolu [Hořejší J., Smetana R.: Acta Med. Scand. 155, 65, 1956], síranu sodného [Amiralian K., Leikhim E. J.: J. Immunol. 87, 301, 1961], chloridu hlinitého [Lewin J.: Therapie 9, 523, 1954], DEAE celulózy [Sober H. A., Pe-terson E. A.: Fed Proc. 17, 1116, 1958; Peter-son E. A., Sober H. A.: J. Am. Chem. Soc. 78, 756, 1956], kyseliny kaprylové [Steinbuch M., Audran R.: Rev. Franc. D'étud. Clin. Biol. 14, 1054, 1969], iontů Zn⁺⁺ a Al⁺⁺⁺ [Rejnek J., Škvařil F.: Coll. Czechoslov. Chem. Com-mun. 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] nebo éteru [Pennell R. B., v Putnam F. W. (ed) The Plasma Proteins vol I Academic Press-New York 1960, str. 9]. Bílkovinný ma-teriál 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 se bílkovinný mate-riál obsahující purifikovaný gama-globulin suspenduje za aseptických podmínek v ta-kovém množství destilované apyrogenní vo-dy, o teplotě 0 °C až +6 °C, aby hodnota koncentrace bílkovin byla v rozmezí 2 % až 15 %, gama-globulinový roztok se vy-čeří filtrací a separace od šarže k šarži se mění koncentrace histaminu z gama-glo-bulinového roztoku se provádí pomocí eluč-ní chromatografie s vylučovací mezí gelu, vyjádřenou molekulovou hmotností nízkomo-lekulárních sloučenin do 10 000 pomocí elu-ce s 0,1% až 3,0% roztokem chloridu sod-ného v destilované apyrogenní vodě o tep-lotě 0 °C až +6 °C s hodnotou pH v rozmezí 6,4 až 7,4 při průtoku 0,01 ml až 3,0 ml za minutu na cm² výtokové plochy gelové čás-ti, přičemž z gelové chromatografické kolo-ny vytekly gama-globulinový roztok se buď sterilizuje filtrací a naředí se za sterilních podmínek na žádanou hodnotu koncentrace gama-globulinu se sterilním roztokem his-

taminu o požadované koncentraci, nebo se takové naředění provádí za nesterilních podmínek a vzniklý směsný roztok o poža-dovaných parametrech se dodatečně sterilizu-je radiační sterilizací, směs se rozplní a po-drobí se dalšímu zpracování, například lyo-filizací.

2. Způsob přípravy podle bodu 1, vyzna-čující se tím, že výchozí bílkovinný mate-riál se suspenduje na hodnotu koncentrace bílkovin v rozsahu 6 % až 8 %.

3. Způsob přípravy podle bodů 1 a 2, vy-značující se tím, že eluce gelově chromato-grafické kolony se provádí s 0,45 až 0,9% roztokem chloridu sodného v destilované apyrogenní vodě při pH 6,90 až 7,00.

4. Způsob přípravy podle bodů 1, 2 a 3, vyznačující se tím, že se sterilní gama-glo-bulinový roztok naředí za sterilních podmí-nek sterilním roztokem histaminu o kon-centraci 0,075 až 0,09 mikrogramu na 1 ml směsného roztoku tak, aby výsledná kon-centrace gama-globulinu byla v rozmezí 0,5 procenta až 0,7 % bílkovin.