



FEDERÁLNY ÚRAD
PRE VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENIU

272 721

(21) PV 9127-87.A
(22) Prihlášené 14 12 87

(40) Zverejnené 13 06 90
(45) Vydané 25 11 91

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵
A 61 K 39/395

(75) Autor vynálezu ŠTĚPÁNEK IVAN ing.CSc., ŠARIŠSKÉ MICHAĽANY

(54)

Spôsob prípravy prípravku obsahujúceho puri-
fikovaný gama-globulín s vysokým obsahom mo-
noméru

(57) Bielkovinný materiál obsahujúci puri-
fikovaný gama-globulín z normálnej alebo
hyperimunnej plazmy prípadne z normálneho,
retroplacentárneho séra alebo hyperimunného
séra ľudského alebo zvieracieho pôvodu s de-
finovanou antibakteriálnou, antitoxickou
alebo antivirovou protilátkovou aktivitou,
sa suspenduje za septických podmienok v ta-
kom množstve destilovanej apyrogennej vody
o teplote 0 °C až + 6 °C, aby hodnota kon-
centrácie bielkovín sa nachádzala v roz-
medzí 5 až 180 gramov na liter, s optimom
60 až 100 gramov na liter, gama-globulinový
roztok sa vyčirí napríklad filtráciou a od-
delenie balastných zlúčenín do molekulárnej
hmotnosti 150000 a nad 250000 sa prevádza
pomocou gelovej filtrácie, dialyzou v kom-
binácii s ultrafiltráciou alebo dialyzou
v kombinácii s elektrodialyzou, diafiltrá-
ciou v kombinácii s ultrafiltráciou, ultra-
filtráciou v prostredí apyrogennej vody ale-
bo v prostredí vodného roztoku chloridu sod-
ného v koncentrácii do 30 gramov na liter,
o teplote 0 °C až + 6 °C s hodnotu pH v roz-
medzí 4,0 až 8,0, pričom takto získaná forma
roztoku monoméru IgG sa zakonzcentrováva,
sterilizuje, upravujú sa v ňom podmienky,
rozplňuje sa, namrazuje a lyofilizuje pričom
v prípade potreby sa roztok pred lyofilizá-
ciou alebo po lyofilizácii podrobí ďalšiemu
spracovaniu napríklad pomocou iontomenej
alebo afinitnej chromatografie.

Vynález sa týka spôsobu prípravy purifikovaného krvného gama-globulínu ľudského alebo zvieracieho pôvodu s vysokým obsahom monoméru, z normálnej alebo hyperimunnej plazmy prípadne z normálneho alebo retroplacentárneho prípadne hyperimunného séra, ktorý je určený pre terapeutické účely.

Až doposiaľ sa realizuje príprava krvného gama-globulínu pre terapeutické účely jednak vo forme prípravy pre intramuskulárne (i.m.) podanie a jednak vo forme pre intravenóznú (i.v.) aplikáciu. Forma prípravy pre i.v. podanie umožňuje podať tento preparát aj i.m. cestou, ale forma prípravy i.m. preparátu je pre i.v. podanie kontraindikovaná.

Na precipitáciu krvného gama-globulínu zo zmesi plazmatických alebo sérových bielkovín sa v celosvetovom merítku najčastejšie používa etanol (Cohn E.J., Gurd F.N.R., Surgenor D.M., Barnes B.A., Brown R.K., Derouaux G., Gillespie J.M., Kahnt F.W., Lewer W.F., Liu C.H., Mittelman D., Mouton R.F., Schmid K., Uroma E.: J.Am.Chem.Soc. 72,465,1950; Deutsch 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.: 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; Kuska J., Kremer J.: Čsl. patent 89170) a frakcia II je najčastejšie používaným východným materiálom pre prípravu gama-globulínu pre terapeutické účely či už pre i.m. tak aj pre i.v. podanie.

Preparáty gama-globulínu pripravené obvyklým spôsobom a vyhovujúce doposiaľ platným kritériam pre i.m. podanie majú agregáčné spektrum, ktoré sa nachádza v rozmedzí 77 - 83 % monoméru, 13 - 22 % diméru a 3 - 7 % polyméru IgG.

Preparáty gama-globulínu pre i.v. podanie vyrobené podľa Štěpánka a Uhríka (Štěpánek I.: AO 202 180; Štěpánek I., Uhrík J.: AO 208 868 a Štěpánek I.: AO 244 306) majú agregáčné spektrum, ktoré sa nachádza v rozmedzí 90 - 96 % monoméru, 4 - 8 % diméru a 0,75 - 2,0 % polyméru IgG.

Testovanie obsahu monoméru, diméru a polyméru IgG v intramuskulárnych a intravenózných preparátoch bolo sprevádzané pomocou gelovej filtrácie na Sephacryle S-3000 s prietokovou registráciou denzity pri 254 nm.

Celosvetová tendencia prípravy i.v. gama-globulinových preparátov zreteľne smeruje ku preferovaniu čo najvyššieho obsahu monoméru IgG a ku preferovaniu čo najnižšieho obsahu iných prímiesí.

Agregáty IgG podané i.m. alebo i.v. cestou môžu vyvolať u pacientov nežiaduce reakcie (Marcus D.M.: J.Immunol. 84,273,1960; Christian C.L.: J.Immunol. 84, 112,1960) pričom sa za príčinu týchto reakcií možno považovať aktiváciu komplementu účinkom agregátov IgG. Aktivovaný komplement je zodpovedný aj za anafylaktické reakcie (Ishizaka T., Ishizaka K., Boros T.: J.Immunol. 87,433,1961). Agregáty IgG jednak aktivujú granulocyty (Koch C., Valerius N.H., Andersen V.: Acta Path.microbiol.Immunol.Scand.Sect. C 92,161,1984) a tiež spôsobujú extracelulárne uvoľňovanie lyzozomových enzýmov (Ferenčík M.: Univ.Comenianae Bratisl. 24,No 1,9,1986).

Podľa imunoelektroforetických analýz gama-globulinového roztoku, izolovaného ako frakcia II podľa Cohna a Oncleya, ktorá sa používa ako východný materiál pre prípravu i.m. a i.v. gama-globulinového preparátu pre terapeutické účely je zrejmé, že tento obsahuje: IgA o molekulárnej hmotnosti 160000 (Franklin E.C.: Nature 195,393,1962), β_{1A} - globulín o molekulárnej hmotnosti 160000 a β_{1C} - globulín o molekulárnej hmotnosti 250000 (Müller-Eberhard H.J., Nilsson J.N., Aronsson T.: J.Exptl.Med. 111,201,1960), albumín o molekulárnej hmotnosti 69000 (Cohn E.J., Hughes W.L., Weare J.H.: J.Am.Chem.Soc. 69,1753,1947), transferín o molekulárnej hmotnosti 90000 (Koechlin B.A.: J.Am.Chem.Soc. 74,2649,1952), IgM o molekulárnej hmotnosti 1000000 (Schultze H.E., Haupt H., Heide K., Möschlin G., Schindtberger R., Schwick G.: Naturforsch. 17b,313,1962).

Súčasná technologická prax na jednej strane sice oddeľuje gama-globulín od zmesi iných krvných bielkovín, ale na druhej strane zanáša do roztoku nízkomolekulárne anorganické alebo organické zlúčeniny. Technologický postup môže taktiež časť niektorých zlúčenín s biochemicko-fyziologickou aktivitou v roztoku gama-globulínu koncentrovať t.j. obohatovať vzhľadom ku ich koncentrácii vo východzej surovine, z ktorej bol gama-globulín izolovaný.

Agregáty IgG môžu vznikať počas skladovania plazmy alebo séra prípadne aj počas skladovania hotového tekutého prípravku, ďalej jednak v procese izolácie a jednak v procese lyofilizácie v dôsledku interakcie nízkomolekulárnych a vysokomolekulárnych látok s molekulami IgG.

Podstatou vynálezu je spôsob prípravy prípravku obsahujúceho purifikovaný krvný gama-globulín s vysokým obsahom monoméru vyznačujúci sa tým, že sa bielkovinný materiál obsahujúci purifikovaný gama-globulín suspenduje za aseptických podmienok v takom množstve apyrogennej destilovanej vody o teplote 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$, aby hodnota koncentrácie bielkovín sa nachádzala v rozmedzí 5 až 180 gramov na liter, gama-globulínový roztok sa vyčirí napríklad filtráciou a oddelia sa balastné zlúčeniny s molekulárnou hmotnosťou do 150000 a nad 250000, potom sa zakoncentrováva ultrafiltráciou, vakuovou destiláciou, vymrazovaním alebo inými metodami, potom sa sterilizuje napríklad filtráciou alebo pomocou iných metód, pred koncovou lyofilizáciou sa roztok stabilizuje napríklad pridaním chloridu sodného, glukózy, maltózy alebo iných cukrov, prevedie sa jeho namrazenie a lyofilizácia pričom v prípade potreby sa roztok podrobí ďalšiemu spracovaniu ako je napríklad iontomenná alebo afinitná chromatografia.

Nedostatkom predkladaného vynálezu je, že oddelenie IgA, 3_{1A} - globulínu a 3_{1C} - globulínu od IgG nebude prevediteľné.

Východziou surovinou môže byť pasta frakcie II, izolovaná metódou podľa Cohna a Oncleya z normálnej alebo hyperimunnej plazmy prípadne z normálneho, retroplacentárneho alebo hyperimunného séra ľudského alebo zvieracieho pôvodu s definovanou antibakteriálnou, antitoxickou alebo antivirovou protilátkovou aktivitou. Taktiež môžu byť použité bielkovinné materiály gama-globulínu izolované pomocou iných metód.

Bielkovinný materiál sa rozpúšťa za aseptických podmienok v takom množstve destilovanej apyrogennej vody o teplote 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$, aby sa hodnota koncentrácie bielkovín nachádzala v rozmedzí 5 až 180 gramov na liter, s optimom 60 až 100 gramov na liter. Rozpúšťanie sa urýchľuje miešaním. Po rozpustení sa gama-globulínový roztok vyčirí napríklad filtráciou.

V technologických pomeroch sú vyššie uvedené optimálne podmienky zpravidla zachované vtedy ak rozpúšťame za aseptických podmienok 1 kg gama-globulínovej pasty v 2.000 ml destilovanej apyrogennej vody o teplote 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$. Hodnota pH takto pripraveného roztoku gama-globulínu býva zpravidla v rozmedzí 60 až 100 gramov na liter.

Takto pripravený roztok gama-globulínu sa vyčirí napríklad filtráciou a nízkomolekulárne ako aj vysokomolekulárne zlúčeniny do molekulárnej hmotnosti 150000 a nad 250000 sa oddelia spôsobom podľa vynálezu pomocou gelovej filtrácie, dialyzou v kombinácii s ultrafiltráciou alebo dialyzou v kombinácii s elektrodialyzou, diafiltráciou v kombinácii s ultrafiltráciou a ultrafiltráciou, oproti destilovanej apyrogennej vode pri teplote 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$ alebo proti vodnému roztoku chloridu sodného o koncentrácii maximálne do 30 gramov na liter, s optimom 3,0 až 9,0 gramov na liter, pri teplote 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$. Všetky pochody prebiehajú v rozmedzí pH 4,0 až 8,0.

Roztok gama-globulínového monoméru, z ktorého boli oddelené balastné prímеси nízkomolekulárnych a vysokomolekulárnych zlúčenín do molekulárnej hmotnosti do 150000 a nad 250000 sa potom zakoncentrováva ultrafiltráciou, vakuovou destiláciou, vymrazovaním alebo inými metodami, potom sa sterilizuje napríklad filtráciou alebo pomocou iných metód, pred

koncovou lyofilizáciou sa upravujú v roztoku podmienky, roztok sa rozplní do flaštičiek a prevedie sa jeho namrazenie. V prípade potreby sa podrobí ďalšiemu spracovaniu.

Vynález je ďalej objasnený na príkladoch prevedenia, ktorými jeho rozsah nieje ani obmedzený ani vyčerpaný.

Príklad 1

Východziu surovinou môže byť pasta frakcie II, izolovaná metódou podľa Cohna a Oncelya z normálnej alebo hyperimunnej plazmy prípadne z normálneho, retroplacentárneho alebo hyperimunného séra ľudského alebo zvieracieho pôvodu s definovanou antibakteriálnou, antitoxickou alebo antivírusovou protilátkovou aktivitou.

Bielkovinný gama-globulínový materiál sa rozpúšťa v takom množstve destilovanej apyrogennej vody o teplote 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$, aby hodnota koncentrácie bielkovín bola v rozmedzí 5 až 180 gramov na liter, s optimom 60 až 100 gramov na liter. Rozpúšťanie sa urýchljuje miešaním. Po rozpustení sa gama-globulínový roztok vyčíri napríklad filtráciou.

V technologických pomeroch sú vyššie uvedené podmienky optima zpravidla zachované vtedy ak rozpúšťame 1 kg gama-globulínovej pasty v 2.000 ml destilovanej apyrogennej vody o teplote 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$. Hodnota pH gama-globulínového roztoku býva zpravidla v rozmedzí 4,0 až 8,0 a koncentrácia bielkovín v rozmedzí 60 až 100 gramov na liter. Takto pripravený roztok purifikovaného gama-globulínu sa vyčíri napríklad filtráciou a separácia balastných prímiesí nízkomolekulárnej a vysokomolekulárnej povahy do molekulárnej hmotnosti 150000 a nad 250000 sa z gama-globulínového roztoku prevedie

A.: Gelovou filtráciou

B.: Dialyzou v kombinácii s ultrafiltráciou alebo dialyzou v kombinácii s elektrodialyzou

C.: Diafiltráciou v kombinácii s ultrafiltráciou

D.: Ultrafiltráciou

A.: V súčasnosti existuje celá rada komerčných materiálov pre gelovú filtráciu na báze dextránových gélov pod označením Sephadex, na báze akrylamidu a dextranu pod označením Sephacryl, polyakrylamidových gélov pod označením Biogel, hydroxyalkylmetakrylátových gélov pod označením Spheron, polystyrenových gélov pod označením Styragel, polyvinilacetátových gélov pod označením Merckogel, poréznych silikátov pod označením Porasil, a poréznych skiel pod označením Bioglas, ktoré majú odstupňované veľkosti pórov v gelových časticiach a umožňujú gelovú filtráciu v pomerne širokých rozmedziach molekulárnych hmotností. Vývoj v danej oblasti rýchlo pokračuje a s najväčšou pravdepodobnosťou technologický pokrok umožní priemyselnú prípravu dokonalejších materiálov než sú súčasne dostupné.

Separácia balastných prímiesí nízkomolekulárnej a vysokomolekulárnej povahy sa prevádza do molekulárnej hmotnosti 150000 a nad 250000 elučnou gelovou chromatografiou s destilovanou apyrogenou vodou alebo s roztokom chloridu sodného v destilovanej apyrogennej vode o koncentrácii do 30 gramov na liter pri teplote 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$ s približnou oblasťou delenia molekulárnych hmotností do 1000000 pričom je potrebné uvedené materiály používať v optimálnom zrnení zaručujúcom prietok v technologických podmienkach.

Ako materiál pre gelovú filtráciu možno použiť aj výrobok fy Chemopetrol k.p. na báze perlovej celulózy pod označením Perloza MT - 500 s vylučovacím limitom molekulárnych hmotností okolo 500000. Ďalej je možné s úspechom použiť Sephacryl S-300 s veľmi jemným zrním alebo Sephacryl S-300 s vysokou rozlišovaciou schopnosťou, ktoré umožňujú prevádzať gelovú filtráciu v rozmedzí molekulárnych hmotností 10000 až 1500000. Jednak Perloza a jednak Sephacryl sú konzervované 0,02 %-ným azidom sodným, ktorý je pred použitím potrebné z uvedených materiálov kvantitatívne odstrániť premývaním.

Do kolony naplnenej napučaným gelovým materiálom nechávame nasávať gama-globulínový roztok takovou rýchlosťou, aby prietok spodnou plochou kolony sa pohyboval medzi 0,01 ml až 3,0 ml za minútu na plochu 1 cm^2 . Množstvo gama-globulínového roztoku nasadeného na kolonu nemá prekročiť 25 až 30 % objemu gelovej časti kolony. Účinnosť delenia je možné sle-

dovať podľa stupňa oddelovania etylalkoholu, chloroformu a ninhydrín pozitívnych látok z gama-globulínového roztoku. Je výhodné mať na výtok z kolony zapojený prietokový spektrofotometer alebo prietokový refraktometer a podľa polohy elučných vrcholov možno bezpečne odhadnúť ako pracuje kolona, ďalej lokalizáciu monoméru a tento oddeliť. Pokiaľ by nedošlo ku dokonalému oddeleniu je potrebné zmenšiť objem vkladaneho gama-globulínového roztoku a spomaliť prietok. Po oddelení monoméru IgG sa tento ďalej spracováva.

B.: Dialýza sa v poslednom desaťročí znovu začína uplatňovať najmä pri výrobe liečiv ako technologická metóda separácie tých zmesí prírodných alebo syntetických látok, ktorých molekuly majú rozdielnú molekulárnu hmotnosť.

V súčasnosti existuje celá rada komerčných membrán pre dialýzu či už v podobe rovinnnej membrány alebo v podobe potrubia o menlivom priemere a menlivej veľkosti pórov na báze regenerovanej celulózy alebo jej derivátov, prípadne na báze kolodia a taktiež na báze vinilových polymérov. Vývoj v danej oblasti rýchlo pokračuje a s najväčšou pravdepodobnosťou technologický pokrok umožní priemyselnú prípravu dokonalejších rovinných a potrubných membrán než sú v súčasnosti dostupné.

Veľkosť pórov v celofánovom dialyzačnom potrubí je možné zväčšiť pomocou namočenia celofánovej folie alebo potrubia do vodného roztoku chloridu zinočnatého do koncentrácie 300 gramov na liter vody (Craig L.C., Konigsberg W.: J.Phys.Chem. 65,166,1961).

Sterilný roztok purifikovaného gama-globulínu sa opatrne presaje do sterilného dialyzačného potrubia, ktoré sa pred zahájením presavania v spodnej časti uzatvorí uzlom a po presatí sa vrchná časť uzatvorí uzlom so smyčkou, za ktorú sa naplnené potrubie zavesí na háčik, ktorý je umiestnený tak, aby roztok gama-globulínu v dialyzačnom potrubí bol v styku s pretekajúcou destilovanou vodou alebo roztokom chloridu sodného v destilovanej apyrogennej vode o koncentrácii do 30 gramov na liter, pri teplote 0 °C až + 6 °C pri pH 4,0 až 8,0 pričom veľkosť pórov v dialyzačnej membráne by mala byť tak veľká, aby umožnila separáciu zlúčenín vyjadrenú molekulárnou hmotnosťou do 150000.

Koniec dialýzy je indikovaný negatívnou reakciou na etanol a chloroform, na prítomnosť albumínu a transferínu v gama-globulínovom roztoku. Po skončení dialýzy sa dialyzačné potrubie s gama-globulínovým roztokom zvesí z háčika, opatrne sa vyberie a po rozstrihnutí sa gama-globulínový roztok preleje do zbernej nádoby a ďalej sa spracováva napríklad ultrafiltráciou alebo diafiltráciou na membráne XM 300, výrobku fy Amicon, pričom sa odstraňuje skupina bielkovín s molekulárnou hmotnosťou nad 250000. Po skončení ultrafiltrácie sa roztok monoméru IgG podrobí ďalšiemu zpracovaniu.

Separáciu monoméru IgG je možné previesť aj pomocou elektrodialýzy v tom usporiadaní, že dialyzačné potrubie s veľkosťou pórov, ktoré prepustia zlúčeniny do molekulárnej hmotnosti 250000 sa umiestni do potrubia o väčšom priemere, ktorého steny prepustia zlúčeniny do molekulárnej hmotnosti 150000. Roztok purifikovaného gama-globulínu sa umiestni do vnútorného potrubia pričom do medziplášťa dáme roztok chloridu sodného v apyrogennej vode o koncentrácii do 30 gramov na liter. Samotná dialýza v tomto usporiadaní či už proti roztoku chloridu sodného alebo proti destilovanej vode pretekajúcim okolo prebieha pomaly.

Urýchlenie procesu dialýzy je možné aj tým, že do roztoku chloridu sodného v ktorom je umiestnený gama-globulín spôsobom vyššie opísaným sa zavedie rovnosmerný elektrický prúd pri použití napätia do 100 V. Elektrodialýza musí prebiehať v nádobe z umelej hmoty a je vhodné ak do seba vložené dialyzačné potrubie sú umiestnené do válcovej formy z umelej hmoty, ktorá sa počas elektrodialýzy otáča, čím sa priebeh elektrodialýzy urýchluje. Pri elektrodialýze je vhodné použiť elektródy z platiny alebo z uhlíku, ktoré sú rovnako dlhé ako dialyzačné potrubie. Tým, že v dôsledku zavedenia prúdu bude na jednej z elektród unikať chlór, bude sa hodnota pH roztoku v ktorom elektrodialýza prebieha zvyšovať. Akonáhle stúpne hodnota pH nad 8,0 je potrebné roztok chloridu sodného v nádobe vymeniť. Je vhodné, ak obsah nádoby je cca 50 násobkom objemu gama-globulínového roztoku vloženého

do vnútornej dialyzačnej trubice. Taktiež je vhodné ak objem medziplášťa dialyzačného potrubia s väčším priemerom je cca 3 násobok objemu gama-globulinového roztoku vloženého do vnútorného dialyzačného potrubia.

Ukončenie elektrodialýzy indikuje negatívna reakcia na etanol, chloroform, albumín a transferín v roztoku monoméru IgG, ktorý sa bude vyskytovať v medziplášťovom priestore odkiaľ sa po skončení elektrodialýzy opatrne vypustí a podrobí sa ďalšiemu spracovaniu.

C.: Prípravu monoméru IgG je možné tiež realizovať pomocou kombinácie diafiltrácie a ultrafiltrácie.

Diafiltráciu, ktorá je vlastne kombináciou dialýzy a ultrafiltrácie je možné realizovať jednak v podobe dutých níťí, pričom gama-globulínový roztok preteká pod miernym tlakom do 500 kPa vo vnútri niťovej membrány a cez póry v stene niťovej membrány prestupujú zlúčeniny s molekulárnou hmotnosťou do 150000 do z vonkajšej strany pretekajúceho roztoku destilovanej vody alebo do roztoku chloridu sodného v destilovanej apyrogennej vode, o koncentrácii do 30 gramov na liter, pri teplote 0 °C až + 6 °C, pri pH 4,0 až 8,0, ktorý zlúčeniny do molekulárnej hmotnosti 150000 unáša od niťovej membrány do odpadu. Veľmi presný obraz o stave oddelenia albumínu alebo transferínu nám poskytne vysokotlaká gélová chromatografia.

Diafiltráciu je možné realizovať aj v podobe kazetového systému, kde v rovinnom usporiadaní je alebo vymeniteľná membrána, prípadne doska z umelej hmoty s definovanou veľkosťou pórov. Gama-globulínový roztok pod miernym tlakom do 500 kPa preteká napríklad nad membránou a cez póry v stene rovinatej membrány alebo poréznej dosky prestupujú veľmi pomalým prietokom zlúčeniny do molekulárnej hmotnosti 150000 do pretekajúceho roztoku apyrogennej vody alebo do vodného roztoku chloridu sodného v destilovanej apyrogennej vode o koncentrácii do 30 gramov na liter, ktoré pretekajú napríklad pod doskou alebo membránou a odplávajú tak zlúčeniny do molekulárnej hmotnosti 150000 do odpadu. Po oddelení zlúčenín do molekulárnej hmotnosti 150000 prevedieme oddelenie zlúčenín nad molekulárnu hmotnosť 250000.

Odstraňovanie zlúčenín s molekulárnou hmotnosťou nad 250000 je možné realizovať pomocou diafiltračne-ultrafiltračnej membrány XM 300, výrobku fy Amicon, ktorá má vylučovaciu medzu molekulárnej hmotnosti 300000. Odstraňovanie zlúčenín s molekulárnou hmotnosťou do 150000 je možné realizovať pomocou diafiltračne-ultrafiltračných membrán XM 100 A alebo YM 100, pričom obe membrány majú vylučovaciu medzu 100000 a sú výrobkom fy Amicon. Vyššie spomínané diafiltračne-ultrafiltračné membrány je možné použiť na prístroji MC-2A alebo na zariadeniach amatérsky pre tento účel zhotovených.

Separáciu zlúčenín s molekulárnou hmotnosťou do 150000 je možné realizovať napríklad pomocou ultrafiltračnej patry H10P100-20 usporiadanej do formy dutých níťí alebo napríklad pomocou ultrafiltračnej špirálovo točenej patry S10Y100, pričom obe ultrafiltračné patry majú vylučovaciu medzu 100000, sú výrobky fy. Amicon a možno ich použiť napríklad na prístroji DC-30 alebo na zariadeniach pre tento účel amatérsky zhotovených. Roztok takto získaného monoméru IgG sa podrobí ďalšiemu spracovaniu.

Vzhľadom na to, že roztok gama-globulínu sa pri diafiltrácii zakoncentrováva, prevedie sa opätovné nariadenie s destilovanou apyrogennou vodou alebo s roztokom sodného v destilovanej apyrogennej vode o koncentrácii do 30 gramov na liter a toto zakoncentrovávanie napríklad na polovičný objem a nariadenie na pôvodný objem sa prevádza dovtedy, pokiaľ je reakcia gama-globulinového roztoku na prítomnosť etanolu a chloroformu, albumínu a transferínu pozitívna. Veľmi presný obraz nám o oddelení albumínu a transferínu poskytne tlaková gélová chromatografia.

Sterilizácia diafiltračného zariadenia sa prevádza totožným spôsobom aký je popísaný pri sterilizácii ultrafiltračnej aparatury.

D.: Ultrafiltrácia je realizovateľná jednak v podobe dutých niťí pričom gama-globulínový roztok preteká vo vnútri niťe pod tlakom do 800 kP a cez póry v stene niťovej membrány prestupujú zlučieniny do 150000 molekulárnej hmotnosti do zbernej nádoby. Vzhľadom na to, že roztok gama-globulínu sa pri ultrafiltrácii zakoncentrováva prevedie sa opätovné nariadenie s destilovanou vodou alebo s roztokom chloridu sodného v destilovanej apyrogennej vode v koncentrácii do 30 gramov na liter a toto zakoncentrovanie napríklad na polovičný objem a nariadenie na pôvodný objem sa prevádza dovtedy pokiaľ je prítomný chloroform, etanol a ninydrín pozitívne látky v retenáte. Veľmi presný obraz o stave oddelenia albumínu alebo transferínu nám poskytne vysokotlaká gélová chromatografia.

Ultrafiltráciu je možné realizovať aj v podobe kazetového systému, kde v rovinnom usporiadaní je alebo vymeniteľná membrána alebo doska z umelej hmoty s definovanými veľkosťami pórov. V súčasnosti sa začínajú zavádzať do praxe rovinné membrány s definovanými veľkosťami pórov špirálovo točené. Gama-globulínový roztok pod tlakom do 800 kP preteká nad membránou a cez póry v stene rovinnnej alebo stočenej membrány alebo poréznej dosky z umelej hmoty prestupujú zlučieniny do molekulárnej hmotnosti 150000 do zbernej nádoby. Špirálovou vinutá membrána má v porovnaní s dutými niťami podstatne väčšiu pracovnú plochu.

Separáciu zlučení s molekulárnou hmotnosťou do 150000 je možné realizovať napríklad pomocou ultrafiltračnej patry H10P100-20 usporiadanej do formy dutých niťí alebo napríklad pomocou ultrafiltračnej špirálovotočenej membránovej patry S10Y100, pričom obe ultrafiltračné patry majú vylučovaciu medzu molekulárnej hmotnosti 100000, sú výrobkami fy Amicon a možno ich použiť napríklad na stroji DC-30 alebo na zariadeniach pre tento účel amatérsky zhotovených.

Gama-globulínový roztok po oddelení zlučení do molekulárnej hmotnosti 150000 sa znovu podrobí ultrafiltrácii napríklad na membráne XM 300, výrobku fy Amicon, ktorá má vylučovaciu medzu molekulárnej hmotnosti 300000. Ultrafiltrácia sa prevádza podobným spôsobom ako vyššie popísaná a prevádza sa dovtedy, pokiaľ nevzrastá už koncentrácia monoméru IgG stanovená vzhľadom na určitý konkrétny objem, o čom operatívne informuje vysokotlaká gélová chromatografia.

Sterilizácia ultrafiltračného zariadenia sa prevádza alebo parou alebo chemickou cestou napríklad prepláchnutím aparatury vodným roztokom formalínu o koncentrácii do 50 gramov na liter s následným vymytím formalínu sterilnou destilovanou apyrogenou vodou o teplote 0 °C až + 6 °C.

Dôkaz chloroformu sa prevádza Fujiwarovou reakciou (Fujiwara: Sitzber. Naturw. Ges. Rostock 6,33,1916) či už v pôvodnom usporiadaní alebo v novších aplikáciách podľa Seta a Schultzeho (Seto T.A., Schultze M.C.: Anal. Chem. 28,1625,1956), Hildebrechta (Hildebrecht C.D.: Anal. Chem. 29,1037,1957), Friedmana a Coopera (Friedman P.J., Cooper J.R.: Anal. Chem. 30,1674,1958).

Ninydrín pozitívne látky stanovujeme spôsobom podľa Ruhemana (Ruheman S.: J. Chem. Soc. 97,1438,1910). Stanovenie etanolu sa prevádza Agulhonovou reakciou (Agulhon H.: Bull. Soc. Chim. France /4/,9,881,1911) či už v pôvodnom usporiadaní alebo v novejších aplikáciách podľa Kelletta (Kellett E.G.: Analyst 62,728,1937) alebo Webba (Webb D.A.: Sci. Proc. Roy. Dublin Soc. 21,281,1936).

Roztok gama-globulinového monoméru, z ktorého boli oddelené balastné prímеси nízkomolekulárnych a vysokomolekulárnych zlučení do molekulárnej hmotnosti 150000 a nad 250000 sa v prípade potreby zakoncentrováva ultrafiltráciou, vakuovou destiláciou, vymrazovaním alebo inými metodami, potom sa sterilizuje napríklad filtráciou alebo pomocou iných metód, pred koncovou lyofilizáciou sa upravujú v roztoku podmienky, roztok sa rozplní do fľaštičiek a prevedie sa jeho namrazenie. V prípade potreby sa podrobí ďalšiemu spracovaniu pomocou iontovej chromatografie alebo afinitnej chromatografie.

Pod úpravou podmienok v roztoku monoméru IgG pred lyofilizáciou rozumieme prídanie chloridu sodného a glukózy do požadovanej koncentrácie po čom následuje úprava hodnoty pH do určitého rozmedzia. Namiesto glukózy je možné použiť aj iné cukry. Dobré stabilizačné účinky vykazuje u gama-globulínu prídanie maltózy do 10 %-nej koncentrácie pred lyofilizáciou (Ochs H.D., Piforsky B., Rousel R.H., Buckley R.H., Fischer S.H., Anderson C.J., Wedgwood R.J.: Lancet 11,1158,1980), alebo prídanie aminooctovej kyseliny v kombinácii s kyselinou epsilon-aminokapronovou (Škvařil F.: Immunoglobulins, National Academy of Sciences, Washington D.C. 1970 str. 165).

Veľký význam pre všetky spôsoby používané v príklade 1 má používanie vody zbavenej mikroskopických mechanických nečistôt, čo je možné realizovať pomocou ultrafiltrácie vody napríklad na ultrafiltrovačnej patrone H10P10-20, výrobok fy Amicon, napríklad na prístroji DC-30 alebo na zariadeniach na tento účel amatersky zhotovených.

Preparáty gama-globulínu pre i.v. a i.m. podanie, vyrobené podľa navrhovaného postupu z cca 99,5 %-ného obsahu monoméru IgG v roztoku v lyofilizovanom stave majú agregáčné spektrum, ktoré sa nachádza v rozmedzí 92-98 % monoméru, 3-6 % diméru pričom nebol detegovaný žiadny polymér IgG. Testovanie obsahu monoméru, diméru a polyméru IgG v lyofilizovanom stave po rozpustení bolo prevádzané pomocou gelovej filtrácie na Sephacryle S-300 superfine s prietokovou registráciou denzity pri 254 nm.

Testovanie obsahu IgA a IgM, v rozpustenom lyofilizovanom preparáte monoméru IgG, pomocou IDP súprav a Q antisér naznačuje, že obsah IgM je v rámci technológie kompletne odstránený, pričom obsah IgA zostáva nezmenený.

Príklad 2

Východziou surovinou môžu byť bielkovinná pasta gama-globulínu alebo roztok gama-globulínu v purifikovanom stave, izolované aj pomocou iných metód. Bielkovinná pasta alebo roztok gama-globulínu sa spracováva podobne ako v príklade 1 s tým rozdielom, že sa nekladie dôraz na stanovenie etanolu a chloroformu, ale na stanovenie precipitačnej látky, ktorá bola použitá na precipitáciu gama-globulínu alebo tej zlúčeniny, ktorá uvoľnila gama-globulín z väzby na niektorom zo sorbentov.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

1. Spôsob prípravy prípravku obsahujúceho purifikovaný krvný gama-globulín s vysokým obsahom monoméru vyznačujúci sa tým, že bielkovinný materiál obsahujúci purifikovaný gama-globulín sa suspenduje za aseptických podmienok v takom množstve apyrogennej destilovanej vody o teplote 0 °C až + 6 °C, aby hodnota koncentrácie bielkovín sa nachádzala v rozmedzí 5 až 180 gramov na liter, gama-globulinový roztok sa vyčirí napríklad filtráciou a oddelia sa balastné zlúčeniny s molekulárnou hmotnosťou do 150000 a nad 250000, potom sa zakoncentrováva ultrafiltráciou, vakuovou destiláciou, vymrazovaním alebo inými metódami, potom sa sterilizuje napríklad filtráciou alebo pomocou iných metód, pred koncovou lyofilizáciou sa roztok stabilizuje napríklad pridávaním chloridu sodného, glukózy, maltózy alebo iných cukrov, roztok sa rozplní, prevedie sa jeho namrazenie a lyofilizácia pričom v prípade potreby sa roztok pred lyofilizáciou alebo po lyofilizácii podrobí ďalšiemu spracovaniu napríklad pomocou iontomennej alebo afinitnej chromatografie.
2. Spôsob podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že oddelenie balastných zlúčenín do molekulárnej hmotnosti 150000 a nad 250000 sa prevádza alebo v prostredí destilovanej apyrogennej vody alebo vo vodnom roztoku chloridu sodného v destilovanej apyrogennej vode o koncentrácii do 30 gramov na liter pri teplote 0 °C až + 6 °C pri pH 4,0 až 8,0.

3. Spôsob podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že oddelovanie balastných zlúčenín s molekulárnou hmotnosťou do 150000 a nad 250000 sa prevádza pomocou gelovej filtrácie, dialýzy v kombinácii s ultrafiltráciou alebo pomocou dialýzy v kombinácii s elektrodialýzou, diafiltrácie v kombinácii s ultrafiltráciou, ultrafiltráciou.
4. Spôsob podľa bodu 1 vyznačujúci sa tým, že bielkovinný materiál z ktorého sa frakcia obsahujúca gama-globulín izoluje je normálna alebo hyperimunná plazma, prípadne normálne, retroplacentárne alebo hyperimunné sérum ľudského alebo zvieracieho pôvodu s definovanou antibakteriálnou, antitoxickou alebo antivirovou protilátkovou aktivitou.