



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

271 872

(21) PV 5362-88.X
(22) Přihlášeno 28 07 88

(40) Zveřejněno 14 03 90
(45) Vydáno 16 09 91

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵
A 61 K 37/14

(75) Autor vynálezu PŘISTOUPIL TOMÁŠ IVAN RNDr. CSc., PRAHA

(54) Způsob přípravy purifikovaného roztoku
oxyhemoglobinu

(57) Řešení se týká pracovního postupu, který urychluje a zjednodušuje některé technické operace spojené s odstraňováním stromat a jejich fragmentů z hemolyzátu; hemolýza se provádí kombinovaným účinkem hypoosmotického pufru a chloroformu, kdy současně s narušením erytrocytární membrány, probíhá extrakce fosfolipidů do organické fáze a zároveň se srážejí rozpuštěným chloroformem některé labilnější komponenty membránové i cytoplasmatické nebo virové. Nízkoobrátkovou centrifugací se vzniklá směs snadno rozdělí na balastní sediment a purifikovaný hemolyzát. Zbytky chloroformu lze odstranit např. v proudu dusíku podstatně rychleji a snáze než případná jiná rozpouštědla s vyšší teplotou varu. Postup pasteurizace deoxyhemoglobinu lze vhodně zařadit do výrobního postupu. Závěrečné zpracování roztoku zahrnuje opět nízkoobrátkovou centrifugaci, dialýzu, zahustění hemoglobinu běžnými technikami a sterilizační filtraci a popřípadě lyofilizaci. Preparát může nalézt uplatnění při vývoji nových zdokonalených roztoků pro perfúzi orgánů pro jejich krátkodobou ochranu před ischemií, popřípadě po modifikaci jako infúzní roztok a dále v analytické biochemii.

Vynález se týká způsobu výroby nativního hemoglobinu z lidských nebo zvířecích červených krvinek k analytickým, perfúzním nebo výhledově infúzním účelům. Oproti dosavadním postupům má navržený způsob větší rychlost a účinnost odstraňování nežádoucích příměsí v hemolyzátu erytrocytů. Jde jak o mechanické částice (erytrocytární stromata a jejich fragmenty), tak o rozpuštěné nehemové bílkoviny nebo fosfolipidy. Postup zahrnuje i možnost odstranění případné virové kontaminace pasteurizací. Příprava nativního hemoglobinu podle vynálezu je jednou z možností, jak využít a prakticky zhodnotit část dosud expirujících erytrocytů z krevních konzerv transfúzní služby.

Podstata obecného řešení způsobu výroby hemoglobinu podle vynálezu spočívá ve vhodné kombinaci a sledu technických operací a o sobě známých postupů, jako je hemolýza, odstraňování, vytřepávání organickým rozpouštědlem, filtrace, deoxygenace, pasteurizace, sterilizační filtrace, adsorpce a lyofilizace. Náš postup vychází z působení chloroformu na promytou exspirovanou erytromasu naředěnou hypoosmotickým pufrům za fyziologického pH, za třepání a intenzivního míchání, v přítomnosti laurylalkoholu k potlačení pění. V těchto podmínkách se výrazně urychlí **hemolýza**, extrakce fosfolipidů do chloroformu i vysrážení některých nehemových bílkovin za tvorby v podstatě třífázového systému: chloroform (spodní fáze) - sraženina nebo emulze (střední fáze) - roztok hemoglobinu. Po nízkoodrátkové centrifugaci se odsaje hemoglobinová vrstva, zbaví se rozpuštěného chloroformu v proudě plynného dusíku. V této fázi je možno roztok zcela deoxygenovat například dithioničitanem a po naředění na 1 až 2% hemoglobin pasteurizovat při 60 °C po 10 h. Během postupného chlazení se zbytky laurylalkoholu odstraní adsorpcí na aktivní uhlí. Po centrifugaci se provede dialýza proti vodě, popřípadě diafiltrace, upraví se koncentrace hemoglobinu, pH, a následuje sterilizační filtrace. Preparát se skladuje za chladu po případné mrazové sublimaci (lyofilizaci).

Konečný roztok (60 až 70 g hemoglobinu/l) má jasně červenou barvu, absorpční spektrum odpovídá nativnímu oxyhemoglobinu. Obsah methemoglobinu činí obvykle 3 % (relativně k celkovému Hb).

Předmět vynálezu je doložen v následujícím příkladu, aniž by byl tímto příkladem omezen.

Příklad

1 objemový díl sterilní exspirované lidské erytromasy (ne starší než 42 dnů po odběru) se při 4 °C promyje centrifugačně při 1 000 g, čtyřikrát po 10 min vždy s přidavkem 3 objemových dílů 0,15M chloridu sodného. K 5 objemovým dílům promyté erytromasy se přidá 10 objemových dílů hemolyzačního roztoku o složení 0,01M fosforečnan sodný pufrující pH 7,5, dále se přidají 3 objemové díly chloroformu a 10⁻³ objemového dílu laurylalkoholu. Směs se intenzivně protřepává a míchá 60 min při 25 °C. Potom se centrifuguje při 2 000 g po dobu 20 min. Červený supernatant se oddělí a zbaví se rozpuštěného chloroformu průchodem čistého dusíku při teplotě 25 až 30 °C během 60 až 90 min. Roztok se upraví na koncentraci hemoglobinu 1%, fosfátového pufru 0,1M při pH 7,5, přidá se dithioničitan sodný do dosažení koncentrace 0,04M a vzorek se v mírném proudě dusíku pasteurizuje zahříváním na 60 °C po dobu 10 h. Ke každým 100 ml roztoku se přidá 0,2 ml aktivního uhlí, směs se postupně chladí za přístupu vzduchu až k 10 °C za míchání, potom se centrifuguje a filtruje na vrstvě Seitz EK. Konečný jasně červený roztok se dialyzuje proti vodě při 4 °C, koncentrace hemoglobinu se upraví například dialyzací na 60 až 70 g/l, pH se upraví na 6,5 až 7,4, roztok se sterilizuje filtrací přes membránové filtry a skladuje za chladu, popřípadě po lyofilizaci s příslušným protektivem.

CS 271872 B1

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob přípravy purifikovaného roztoku oxyhemoglobinu z exspirované lidské nebo zvířecí erytromasy za použití **obecně** známých materiálů a postupů jako je hemolýza, odstřeďování, vytřepávání, filtrace, diafiltrace, deoxygenace, pasteurizace, sterilizační filtrace a lyofilizace, přičemž konkrétní pracovní postup, vyznačující se tím, že 4 až 6 objemových dílů promyté erytromasy se hemolyzuje 8 až 12 objemovými díly 0,005 až 0,03M pufru o pH 6,6 až 7,6 v přítomnosti 3 až 6 objemových dílů chloroformu s přídavkem 10^{-4} až 10^{-3} objemových dílů laurylalkoholu za třepání a míchání této směsi při teplotě 25 až 30 °C po dobu 30 až 90 min, potom se vzniklá suspenze centrifuguje při 2 000 až 4 000 g za teploty 5 až 25 °C, potom se červený supernatant zbaví chloroformu odpařením, v proudu inertního plynu, potom se hemoglobin naředí na koncentraci 10 až 30 g/l fosfátovým pufrům pH 7 až 7,8 a po redukci, respektive deoxygenaci na deoxyhemoglobin se pasteurizuje zahříváním na 60 až 65 °C po dobu 1 až 10 h, potom se přidá aktivní uhlí k odstranění laurylalkoholu a některých dalších příměsí, po ochlazení za přístupu vzduchu se směs centrifuguje, filtruje, dialyzuje proti vodě nebo 0,03 až 0,15M chloridu sodnému, koncentrace hemoglobinu se upraví na 50 až 70 g/l, pH na 6,5 až 7,5, potom se roztok sterilizuje filtrací a skladuje za chladu po případné lyofilizaci.