



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU

## K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

236 096

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita  
(22) Přihlášeno 31 05 83  
(21) PV 3885-83

(51) Int. Cl.<sup>1</sup> C 07 G 7/00

(40) Zveřejněno 17 09 84  
(45) Vydáno 01 12 86

(75)

Autor vynálezu PARDON JAN ing.  
SLUNEČKO MILOSLAV

PEŠKOVÁ DANICA PhMr.  
ULRYCH STANISLAV RNDr., PRAHA

(54) Způsob přípravy roztoku sérového albuminu s nízkým obsahem nízkomolekulárních sloučenin

Vynález řeší způsob přípravy roztoku sérového albuminu s nízkým obsahem nízkomolekulárních sloučenin. Uvedené sloučeniny, doprovázející izolovanou albuminovou frakci, se vyznačují vlastnostmi, které v některých případech kontraindikují možnost aplikace a nemají terapeutické účinky.

Podstatou vynálezu je odstranění shora uvedených sloučenin, přítomných v neomezené koncentraci, diafiltrací na definovaných membránách tubulárního nebo plošného typu, určených pro zahušťování roztoků biomakromolekul. Izolovaná albuminová frakce ve vodném roztoku je diafiltrována při výchozí koncentraci 2 až 20%hmot. bílkovin proti vodě pro injekci, přidávané plynule za konstantního objemu nebo v určených objemech. Způsob se vyznačuje nízkou spotřebou vody a tím i nízkou energetickou spotřebou a vysokou účinností a rychlostí, která snižuje riziko kontaminace.

Vynález řeší způsob přípravy roztoku sérového albuminu s nízkým obsahem nízkomolekulárních sloučenin.

V současné době používané způsoby izolace sérového albuminu pro terapeutické nebo jiné účely, jako je výroba kosmetických a dietetických přípravků, získávají preparát, který je doprovázen nízkomolekulárními sloučeninami. V případě, že má být preparát použit pro terapeutické účely, je jeho účinnost přítomností uvedených látek snižována, v některých případech je aplikace dokonce kontraindikována. Z tohoto důvodu někteří výrobci zařazují za izolační postup purifikační kroky, kterými obsah nízkomolekulárních podílů před konečným koncentrováním albuminové frakce a farmaceutickým zpracováním snižují.

Potřeba odstranění nízkomolekulárních podílů vzniká u všech dosud známých způsobů izolace albuminové frakce, ať už se jedná o nízkomolekulární sloučeniny, pocházející z výchozího materiálu plasmatických bílkovin - plasmy dárců, séra, sušené plasmy nebo t.zv. náhradních surovin, t.j. retroplacentárního séra, nesterilních zbytků plasmy, erytrocytárních mas a K-plasmy, nebo o nízkomolekulární sloučeniny, použité při některém z dále uvedených způsobů izolace:

Izolační techniky lze rozdělit do několika skupin:

postupy založené na selektivní precipitaci, ionexové chromatografii, gelové chromatografii, afinitní chromatografii a na selektivní tepelné denaturaci, nebo na kombinaci těchto postupů. Nejčastěji používané metodiky izolace albuminu srážením etanolem za nízkých teplot vychází z původní práce Cohn E.J., Strong L.E., Hughes W.L., Mulford D.J., Ashworth J.N., Melin M. and Taylor H.L.: J.Amer.Chem.Soc. 68,459-475, 1946, z které vychází i isolační metoda použitá pro dále uvedené příklady provedení podle A.O. 194957 - Pokorný M., Foukal Z., Pardon J.: Způsob izolace lidského sérového albuminu. Potřeba odstranění nízkomolekulárních sloučenin je aktuální i u dalších metod, kdy je jako srážecího činidla použito síranu ammonného (Schultze H., Schönenberger M., Matheka H.D.: Behringwerke Mitt. 26,21,1952), rivanolu (Hořejší J., Smetana R.: Acta Med.Scand. 155,65-68, 1956), kyseliny kaprylové (Chanut A., Curnish R.R.: Arch.Biochem.Biophys. 89, 218-220, 1960), polyethylenglykolu (Polson A., Potgieter G.M., Largier J.F., Mears G.E.F., Joubert F.J.: Biochim. Biophys. Acta 82, 463-475, 1964). Srážení polyethylenglykolem kombinuje s ionexovou chromatografií Curling (Curling J.M., Berglöff J., Lindquist L.O., Eriksson S.: Vox Sang 33, 97-107, 1977), použití afinitní chromatografie pro přípravu čistého albuminu popisuje Harvey (Curling J.M. (ed.): Methods of plasma protein fractionation, Academic Press, 1980), *použití polysulfonové membrány pro frakcionaci popisuje DEO 3044773.*

Společným znakem uvedených postupů je sice selektivní oddělení albuminu od ostatních bílkovin krevní plasmy, ale zároveň zvýšení nízkomolekulární složky o další anorganické nebo

organické sloučeniny, zejména chlorid sodný, octan sodný a nízkomolekulární peptidy, vzniklé štěpením bílkovin během frakcionace, nebo obsažené ve výchozí surovině a doprovázející albumin až do finálního stadia farmaceutického zpracování. Tyto sloučeniny tvoří až 4% nečistot konečného preparátu a jsou přítomny ve volné formě nebo vázané na molekulu albuminu. Jejich přítomnost snižuje osmotickou i transportní kapacitu preparátu. K odstranění nízkomolekulárních podílů z roztoků albuminu se používá metod založených na principu gelové chromatografie na zesíťovaných dextranových gelech (Friedli H., Fournier E., Volk T., Kistler P.: Vox Sang. 33,93-96,1977). Štěpánek I. a Uhrík J. používají pro odstranění nízkomolekulárních podílů protiproudé dialýzy.. Preparaát bývá označován "salt poor albumin" nebo albumin s nízkým obsahem nízkomolekulárních látek.

Uvedené nedostatky odstraňuje navrhovaný způsob odstranění etanolu a solí, využívající membránové systémy s definovanou hranicí dělení molekul ve formě plochých membrán nebo dutých vláken, používané ke koncentrování biopolymerů. Podstata odstraňování nízkomolekulárních podílů, pocházejících z výchozích materiálů, a frakcionačních technik, použitých k izolaci albuminu, spočívá podle předloženého vynálezu v tom, že roztok purifikovaného albuminu v redestilované vodě se po filtraci ředí vodou pro injekci ve skocích nebo plynule za konstantního objemu a diafiltruje na ultrafiltrační jednotce, osazené membránou ve formě ploché membrány (Flat membranes) nebo soustavou dutých vláken (Hollow fibres) s definovanou hranicí dělení mole-

kul menších než  $10^4 D$ . Proces probíhá za aseptických podmínek při teplotách v rozmezích  $0 - 45^{\circ}C$ , čímž lze ovlivňovat jeho rychlost vzhledem ke změnám rheologických vlastností roztoku albuminu, v rozmezí koncentrací  $2 - 20\%$  hmot., s výhodou v rozmezí  $8 \pm 2\%$  hmot. Při použití výchozího roztoku, který obsahuje  $5 - 10\%$  hmot. albuminu a  $5 - 10\%$  obj.etanolu, poklesne koncentrace etanolu pod hranici  $0,5\%$  obj.etanolu a obsah sodíku pod  $174 \text{ mmol/l}$  při spotřebě vody pro injekci odpovídající pětinásobku výchozího objemu.

Z uvedeného vyplývá časová i nákladová efektivnost proti shora uvedeným způsobům, které vyžadují nákladné materiály pro gelovou chromatografii, resp. 200 násobné množství redestilované vody k dialýze. Získaný diafiltrát lze zahustit na koncentraci obvyklými postupy, t.j. lyofilizací nebo odpařením nebo lze s výhodou použít téhož zařízení pro ultrafiltraci, na kterém se obsah albuminu zvýší na koncentraci vyšší než  $20\%$ , a po sterilní filtraci a doplnění stabilizátorů je obvyklým způsobem převeden do aplikační formy, t.j. do roztoku obsahujícího  $5$  nebo  $20\%$  hmot. albuminu.

## PŘÍKLADY PROVEDENÍ

### Příklad č.1.

Sediment frakce V výrobní šarže o celkové hmotnosti  $23 \text{ kg}$  byl suspendován v redestilované vodě o teplotě  $+4^{\circ}C$  v poměru  $2 \text{ l}$  vody na  $1 \text{ kg}$  sedimentu. Rozoftk po přidání aktivního uhlí v množství  $50 \text{ g}$  na  $1 \text{ kg}$  sedimentu frakce V a promíchání byl zfiltrován přes asbestocelulózové filtrační vrstvy Seitz K5 a

EKS2. 68 l filtrátu o pH 6,40 obsahovalo 8,3% obj.etanolu a 8% hmot.bílkovin, z toho 93% albuminu. Roztok byl diafiltrován na aparatuře Alfa Laval UFP osazené ultrafiltrační patronou typu dutých vláken HF 26.5-43-PM10 firmy Romicon o celkové ploše 2,5 m<sup>2</sup>, dělicí molekuly do 10<sup>4</sup>D, objem byl doplňován vždy po dávkách 8 l apyrogenní vody pro injekci, celková spotřeba 138 l vody. Po diafiltraci byl roztok zahuštěn ultrafiltrací na objem 24,5 l o koncentraci 17,5% albuminu. Přidáním 500 g lyofilizovaného albuminu byla koncentrace upravena na 20% a roztok byl po přidání stabilizátoru (0,02M kaprylan sodný a 0,02M N-acetyl-d,l-tryptofan) běžným způsobem pasteurizován, sterilně zfiltrován, rozplněn a podroben předepsaným chemickým, biologickým a klinickým zkouškám, na základě kterých byl propuštěn a expedován.

|                                 |                            |
|---------------------------------|----------------------------|
| čistota elfo                    | 98,7 % hmot.               |
| bílkoviny                       | 19,1 % hmot.               |
| pH                              | 7,03                       |
| vzhled                          | 11, 13, 19 nef.jednotek    |
| tep.stabilita                   | 11, 14, 21 nef.jednotek    |
| obsah hemu                      | 0,045 mg/1g albuminu       |
| obsah Na                        | 52,2 mmol/l                |
| sterilní                        |                            |
| neškodný                        |                            |
| apyrogenní                      | 0,6 0,8 1,0 <sup>0</sup> C |
| bez reakcí při klinické zkoušce |                            |

Příklad č.2.

236 098

Roztok albuminu, připravený analogickým způsobem jako v příkladě č.1, obsahoval 7,6% hmot.bílkovin, z toho 91,8% hmot.albuminu, a 8,1% obj. stanolu v 70 l. K diafiltraci bylo použito zařízení Pellicon fy Millipore osazené 10 kasetami plochých membrán typu PTGC o celkové ploše 46 m<sup>2</sup>, dělicí molekuly do 10<sup>4</sup>D, objem byl doplňován vodou pro injekci v pěti dávkách po 35 l. Po diafiltraci byl roztok zahuštěn na 22,15 l o koncentraci 23,4% hmot.albuminu na stejném zařízení. Po úpravě koncentrace na 20% hmot. a přidání stabilizátoru byl roztok běžným způsobem pasteurizován, sterilně zfiltrován, rozplněn a podroben předepsaným chemickým, biologickým a klinickým zkouškám, na základě kterých byl propuštěn a expedován.

|                                 |                          |
|---------------------------------|--------------------------|
| čistota elfo                    | 97,9% hmot.              |
| bílkoviny                       | 19,7% hmot.              |
| pH                              | 6,68                     |
| vzhled                          | 12, 14, 17 nef.jednotek  |
| tep. stabilita                  | 11, 12, 13 nef. jednotek |
| obsah hemu                      | 0,047 mg/1g albuminu     |
| obsah balení                    | 100 ml                   |
| obsah Na                        | 56,55 mmol/l             |
| sterilní                        |                          |
| neškodný                        |                          |
| apyrogenní                      | 0,4 0,2 0,6 °C           |
| bez reakcí při klinické zkoušce |                          |

Příklad č.3.

238 098

Roztok albuminu připravený analogickým způsobem jako v příkladě č.1 obsahoval 7,8% obj.etanolu a 8,3% hmot. bílkovin, z toho 92,3% albuminu, v 87 l. K diafiltraci bylo použito zařízení Pellicon fy Millipore osazené 10 kasetami plochých membrám typu PTGC o celkové ploše 46 m<sup>2</sup>, dělící molekuly do 10<sup>4</sup>D, objem byl doplňován vodou pro injekci v pěti dávkách po 43 l. Po diafiltraci byl roztok lyofilizován. 6640 g lyofilizátu bylo rozpuštěno na 33 l 20%ního roztoku a po přidání stabilizátoru byl roztok běžným způsobem pasteurizován, sterilně zfiltrován, rozplněn a podroben předepsaným chemickým, biologickým a klinickým zkouškám, na základě kterých byl propuštěn a expedován.

|                                 |                          |
|---------------------------------|--------------------------|
| čistota elfo                    | 97,7% hmot.              |
| bílkoviny                       | 19,7% hmot.              |
| pH                              | 6,71                     |
| vzhled                          | 10, 12, 15 nef. jednotek |
| tep.stabilita                   | 18, 22, 24 nef. jednotek |
| obsah hemu                      | 0,055 mmol/l             |
| obsah balení                    | 102 ml                   |
| obsah Na                        | 56,55 mmol/l             |
| sterilní                        |                          |
| neškodný                        |                          |
| apyrogenní                      | 0,4 0,3 0,1°C            |
| bez reakcí při klinické zkoušce |                          |

## PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy roztoku sérového albuminu s nízkým obsahem nízkomolekulárních sloučenin vyjádřeným obsahem sodíku, který je menší než 174 mmol/l pro 20% hmot. roztok albuminu, vyznačující se tím, že vodný roztok purifikovaného albuminu se po filtraci zředí roztokem s obsahem sodíku nižším než 174 mmol/l a podrobí se diafiltraci na plochých membránách nebo ultrafiltračních patronách s hranicí dělení  $10^4$  až  $10^5$  D proti danému roztoku nejméně čtyřnásobným vyředěním a takto získaný roztok se zahustí na požadovanou koncentraci 5 až 20% hmot. albuminu.