



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 210 088

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 02 11 79
(21) PV 7457-79

(11)

B1

(51) Int. Cl.³ A 61 K 37/02//
A 61 K 35/16

(40) Zveřejněno 30 04 81
(45) Vydáno 30 04 1982

(75)

Autor vynálezu LIBICH MIROSLAV, PRAHA

(54) Způsob přípravy lidského sérového albuminu ze séra, plasmy, nebo surovin, obsahujících hemoglobin

Způsob přípravy lidského sérového albuminu ze séra, plasmy, nebo surovin, obsahujících hemoglobin. Účelem vynálezu je umožnění jednoduché přípravy čistého lidského sérového albuminu z dárcovské plasmy nebo i z náhradních surovin, obsahujících hemoglobin při zachování možnosti výroby gama globulinu. Toho je dosaženo tím, že balastní bílkoviny, přítomné v roztoku surového albuminu jsou denaturovány kombinovaným působením zvýšené teploty, chloroformu a kyseliny kaprylové; denaturované balasty jsou převedeny do sraženiny, která se z roztoku čistého albuminu odstraní.

Vynález se týká způsobu přípravy lidského sérového albuminu ze séra, plasmy, nebo surovin, obsahujících hemoglobin.

V posledních letech je možno v literatuře pozorovat stoupající snahu nahradit doposud užívaný způsob přípravy sérových albuminů pomocí frakcionace ethanolem jinými, levnějšími způsoby. Tak byl popsán způsob přípravy čistých sérových albuminů, založený na srážení balastních bílkovin kombinovaným denaturačním působením tepla a chloroformu při teplotě 50 °C /Libich M., čs.pat. 129 936/. Později byla popsána další denaturační metoda, využívající pouze zvýšené teploty bez chloroformu, a to 68 °C; při této vysoké teplotě je už nezbytně nutné chránit albumin před denaturací kaprylátem /Schneider, Lefèvre H., Fiedler H., Mc Carty L.J.: Blut, 30, 121, 1975/.

Předmětem zmíněného čs. patentu 129 936 je způsob přípravy čistých sérových albuminů z normálních i hemolyzovaných sér a plasem, vyznačující se tím, že se balastní bílkoviny a barviva, obsažená v roztoku surového sérového albuminu, převedou do sraženiny kombinovaným denaturačním působením zvýšené teploty a chloroformu a způsob, vyznačující se tím, že se 5 až 8 % roztok surového albuminu zahřeje spolu s 10 objemovými % chloroformu při pH 4,95 až 5,05 za stálého míchání na teplotu 50 °C, načež se utvořená sraženina odstraní, supernatant se sfiltruje a po úpravě pH na hodnotu 6,5 až 7,0 lyofilizuje.

Podle tohoto patentu je možno vyrábět jak různé zvířecí, tak i lidský albumin. Ukázalo se však, že vzhledem k různým specifickým fyzikálně chemickým vlastnostem jednotlivých druhů albuminu je výhodné přizpůsobit reakční podmínky, jako je teplota během denaturace, pH a pod. každému druhu albuminu zvlášť.

Při výrobě lidského albuminu z náhradních surovin, obsahujících hemoglobin / na př. z retroplacentárního séra nebo z erythromas / podle zmíněného patentu se objevila potíž, která bránila velkoprovoznímu využití. Tyto suroviny obsahují železo, vázané na sérovou bílkovinu transferin. Navázáním železa se vlastnosti transferinu změni natolik, že tato sérová bílkovina během přípravy lidského sérového albuminu podle čs.pat. 129 936 nepřechází už do sraženiny balastů, ale zůstává v roztoku spolu s albuminem a snižuje tak čistotu preparátu pod přípustnou mez. Dále bylo zjištěno, že kyselina kaprylová v kombinaci s chloroformem silně podporuje přechod denaturovaných balastních bílkovin do sraženiny, je-li přítomna v koncentraci kolem 0,5 hmot.%; bez chloroformu byl účinek kyseliny kaprylové zcela nedostačující k tomu, aby za dané teploty 50 °C bylo odsazeno potřebné minimální čistoty albuminu 96 %. Kyselina kaprylová v kombinaci s chloroformem dovolila tak snížit potřebnou denaturační teplotu o dalších 5 °C, tedy přibližně na pouhých 45 °C. Kyselina kaprylová tedy v tomto případě nehraje roli tepelného stabilizátoru - to vzhledem k nízké denaturační teplotě není zapotřebí - ale roli faktoru, podporujícího v kombinaci s chloroformem přechod balastů do sraženiny; k tomu je nutno použít přibližně 10x vyšší koncentrace kyseliny kaprylové, než by bylo třeba k tepelné stabilizaci albuminu.

Dalším výzkumem bylo zjištěno, že dokonalejších výsledků jak v dosažené čistotě albuminu, tak i v jeho výtěžku, včetně úplného odstranění potíží při výrobě albuminu ze surovin, obsahujících železo, vázané na transferin, lze docílit způsobem podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se balastní bílkoviny ve výchozím roztoku sérových

bílkovin, obsahujícím 1 až 10 hmot. % albuminu denaturují kombinovaným působením teploty 35 až 55 °C, chloroformu v množství 2 až 10 hmot. % a kyseliny kaprylové v množství 0,1 až 2 hmot. %, při pH 5,3 až 7,0, denaturované balasty se převedou do sraženiny při pH 4,5 až 5,5 a při teplotě nejvýše 45 °C, načež se sraženina balastů odstraní.

Zejména je výhodné připravovat lidský albumin tak, že se výchozí roztok sérových bílkovin, obsahující 4 až 5 hmot. % albuminu denaturuje při 45 °C za přítomnosti chloroformu v množství 5 hmot. %, kyseliny kaprylové v množství 0,4 hmot. %, při pH 5,8 až 6,0, denaturované balasty se převedou do sraženiny při pH 5,0 až 5,1 a při teplotě 40 °C, načež se sraženina balastů odstraní.

Za nežádoucí přítomnosti železa, vázaného na transferin je výhodné připravovat lidský albumin tak, že se výchozí roztok sérových bílkovin zbaví iontů železa i železa, vázaného na transferin působením látky, vázající železo do komplexu nebo do nedisociovatelné sloučeniny, s výhodou působením dvojsodné soli kyseliny ethyléndiamintetraoctové v koncentraci 0,01 až 0,1 hmot. %.

Příprava lidského sérového albuminu podle tohoto vynálezu má řadu předností. Především je způsob přípravy podle vynálezu mimořádně šetrný vůči albuminu /pracuje s teplotou okolo 45 °C na rozdíl od zmíněné Schneiderovy metody, pracující s teplotou 68 °C/. Lidský albumin, připravený podle čs.pat. 129 936, tedy dokonce při teplotě 50 °C, vykazoval při předběžných testech biologický poločas v lidském organismu kolem 22 dní, tedy stejný jako normální nativní albumin, zatímco souběžně testované tuzemské i zahraniční komerční preparáty lidského albuminu, připravené etanolovou frakcionací vykazovaly poločasy podstatně kratší, což svědčí o snížené nativitě těchto preparátů. Rychlé odbourávání aplikovaného albuminu znamená značnou zátěž organismu pacienta a zvýšené nebezpečí nežádoucích reakcí. Další předností přípravy lidského albuminu podle vynálezu je vysoká výtěžnost albuminu, která se při vlastním denaturačním procesu blíží 100 %; výrobní ztráty tedy závisí jen na nezbytných pomocných operacích, jako je např. filtrace a pod. Velkou výhodou přípravy albuminu podle vynálezu je mnohem levnější a jednodušší technologie ve srovnání s dosud užívanou etanolovou frakcionací za chladu; není zapotřebí žádných chlazených výrobních prostorů a spotřeba energií a pracovní doby je podstatně nižší. Velmi výhodná je i poměrná necitlivost na případné překročení předepsaného výrobního postupu, např. nedodržení předepsané teploty při denaturaci, doby zahřívání, pH a pod. Tak např. při zahřívání jen na 40 °C bylo pozorováno jen nepodstatné snížení čistoty konečného preparátu a ani při zahřívání na 60 °C nebyly ještě naměřeny ztráty albuminu denaturací. Také pH během denaturace se mohlo odchylovat od střední hodnoty 5,9 o několik desetin pH směrem nahoru i dolů bez podstatného ovlivnění výsledku. Poměrně kritické je jen nastavení pH potřebného pro dokonalé vysrážení balastů z roztoku, t.j. pH 5,0 až 5,1, kdy při nedodržení pH o několik desetin směrem dolů klesá výtěžek a směrem nahoru klesá čistota albuminu.

Jednou z největších předností způsobu přípravy lidského albuminu podle vynálezu je však možnost zpracovávat na čistý albumin i náhradní suroviny, obsahující hemoglobin, např. retroplacentární sérum nebo erythromasy; veškerá barviva jsou z preparátu během purifikačního procesu dokonale odstraněna.

Naproti tomu např. zmíněná denaturační metoda Schneiderova nemůže vycházet ze surovin, obsahujících hemoglobin, protože krevní barviva přecházejí při jejím použití do albuminu. Při trvalém nedostatku výchozí suroviny - lidské krve - dá se předpokládat, že výroba albuminu z barevných náhradních surovin bude mít i v budoucnu vzestupnou tendenci nejen u nás, ale i v zahraničí. Při výrobě albuminu podle vynálezu zůstává zachována možnost výroby i dalších důležitých krevních derivátů, např. gama globulinu.

Denaturace balastních bílkovin podle vynálezu se provádí např. v uzavřeném nerezovém kotli s míchadlem a dvojitými stěnami, mezi které je možno napouštět teplou nebo studenou vodu k vyhřívání nebo chlazení směsi. Vytvořená sraženina balastů se oddělí od roztoku čistého albuminu filtrací nebo centrifugací.

PŘÍKLAD 1.

Výchozí roztok surového albuminu je možno připravit libovolnou technologií, pomocí které se rozdělí původní sérum nebo plasma na frakci surových globulinů a frakci surového albuminu. Účelem tohoto předběžného dělení je zachování gama globulinové frakce pro další zpracování na čistý gama globulin. Je výhodné, obsahuje-li výchozí roztok surového albuminu 4 až 8% albuminu. Postup, popsáný v tomto příkladě, je vhodný pro přípravu čistého albuminu z roztoku surového albuminu, neobsahujícího ethanol, např. z roztoku surového albuminu, který byl získán vysolením albuminové frakce mezi 50 až 75 % nasycením séra nebo plasmy siranem amonným a dialyzou. Předem se připraví směs chloroformu a kyseliny kaprylové, obsahující 8 hmot.% kyseliny kaprylové. Roztok surového albuminu se převede do uzavřeného nerezového kotle, opatřeného míchadlem a dvojitými stěnami. Spustí se míchadlo a přidá se 5 hmot.% směsi chloroformu a kyseliny kaprylové; dále se přidá 0,01 hmot.% dvojsodné soli kyseliny ethyléndiamintetraoctové /byla-li výchozí surovinou normální lidská plasma/, nebo až 0,04 hmot. % dvojsodné soli kyseliny ethyléndiamintetraoctové /byla-li výchozí surovinou náhradní barevná surovina, obsahující železo, vázané na transferin/. Pokud bylo železo, vázané na transferin dokonale odstraněno již v předchozím frakcionačním stupni, nepřidává se dvojsodná sůl kyseliny ethyléndiamintetraoctové vůbec. Po 10 minutovém míchání při teplotě místnosti se pomocí 1N-HCl, případně 1N-NaOH upraví pH směsi na hodnotu 6,0. Do pláště kotle se potom vpouští teplá voda, až je dosaženo teploty směsi 45 °C; tato teplota se udržuje po dobu 3 minut. Pak se do pláště kotle vpouští studená voda, až je směs ochlazená na 40 °C. Při této teplotě se upraví pH směsi na hodnotu 5,0 až 5,1 pomocí 1N-HCl; úprava pH nemá trvat déle než 5 minut. Po úpravě pH se směs ochladí na teplotu nejvýše 25 °C a vytvořená sraženina balastů se odstraní filtrací nebo centrifugací. Potom se pH směsi upraví na hodnotu 7,0 a kyselina ethyléndiamintetraoctová se váže do komplexu přidávkou ekvivalentního množství vápenaté soli, nebo se odstraní jiným známým způsobem. Není-li možno provést úpravu pH na hodnotu 5,0 až 5,1 při 40 °C spolehlivě do 5 minut, směs se před úpravou pH nejprve ochladí na teplotu nejvýše 25 °C, potom se upraví pH a směs se opět zahřeje na teplotu 40 °C na dobu 2 až 5 minut.

PŘÍKLAD 2.

Následující postup je vhodný pro výchozí roztok surového albuminu, který obsahuje 4 až 5 hmot.% ethanolu, např. pro roztok frakce IV+V, získané ethanolovou frakcionací za

chladu. Postup je stejný, jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že se k roztoku surového albuminu přidají pouze 3 hmot.% chloroformu při zachování 0,4 hmot.% kyseliny kaprylové v denaturované směsi. Postup za přítomnosti alkoholu je méně výhodný, protože je třeba přísněji dodržovat podmínky denaturace /teplotu, dobu zahřívání/.

Preparáty, připravené podle uvedených postupů měly elektroforetickou čistotu kolem 97 % /při denaturační teplotě 45 °C/ nebo téměř 100 % /při denaturační teplotě 55 až 60 °C/ a nevykazovaly žádné známky denaturace nebo jiného poškození albuminu. V předběžných testech bylo dokonce zjištěno, že preparáty lidského albuminu, připravené při 50 °C podle původního čs. pat. 129 936 /tedy za nepřítomnosti tepelných stabilizátorů albuminu/ vykazují biologický poločas v lidském organismu 22 dní, tedy jako nepoškozený, nativní lidský albumin. Naproti tomu všechny srovnávané komerční preparáty lidského albuminu, tuzemské i zahraniční, vyrobené ethanolovou frakcionací za chladu, vykazovaly biologické poločasy podstatně kratší /nejvýše 16 dní/. Výtěžek albuminu, připraveného podle vynálezu, se při vlastní denaturační proceduře blížil 100 %, takže výrobní ztráty závisí jen na nezbytných dalších operacích, např. při filtraci a pod.

Možnost uplatnění vynálezu spočívá v jeho zavedení při výrobě lidského sérového albuminu. Vynález představuje účinný purifikační stupeň, která sám o sobě zajišťuje vysokou elektroforetickou čistotu a nízkou barevnost konečného produktu. Odpadá tedy náročná frakcionace ethanolom za chladu a kromě toho je možno vycházet z náhradních surovin, obsahujících vysoká množství krevních barviv. V předoperační se provede jen hrubé rozdělení výchozí suroviny na surový gama globulin a surový albumin; v konečné fázi je možno použít dalších známých postupů, vedoucích až k infusnímu roztoku albuminu. Výroba lidského albuminu s využitím vynálezu je podstatně jednodušší, levnější a méně náročná na spotřebu energií a pracovní doby ve srovnání s výrobou albuminu ethanolovou frakcionací za chladu. Není zapotřebí žádných chlazených výrobních prostorů a technologické zařízení je jednoduché. Pokud bude v dalších podrobných testech potvrzen dlouhý biologický poločas preparátu, vyrobeného podle vynálezu / srovnatelný s poločasem nativního albuminu/, byl by získán preparát nových kvalitativních vlastností ve srovnání s dosud užívanými komerčními albuminy, připravenými ethanolovou frakcionací.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob přípravy lidského sérového albuminu ze séra, plasmy, nebo surovin, obsahujících hemoglobin, vyznačující se tím, že se balastní bílkoviny ve výchozím roztoku sérových bílkovin, obsahujícím 1 až 10 hmot.% albuminu denaturují kombinovaným působením teploty 35 až 55 °C, chloroformu v množství 2 až 10 hmot.% a kyseliny kaprylové v množství 0,1 až 2 hmot.%, při pH 5,3 až 7,0, denaturované balasty se převedou do sraženiny při pH 4,5 až 5,5 a při teplotě nejvýše 45 °C, načež se sraženina balastů odstraní.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se výchozí roztok sérových bílkovin, obsahující 4 až 5 hmot.% albuminu denaturuje při 45 °C za přítomnosti chloroformu v množství 5 hmot.%, kyseliny kaprylové v množství 0,4 hmot.%, při pH 5,8 až 6,0, denaturované balasty se převedou do sraženiny při pH 5,0 až 5,1 a při teplotě 40 °C, načež se sraženina balastů odstraní.

3. Způsob podle bodu 1 a 2 za nežádoucí přítomnosti železa, vázaného na transferin vyznačující se tím, že se výchozí roztok sérových bílkovin zbaví iontů železa i železa, vázaného na transferin působením látky, vážající železo do komplexu nebo do nedisociovatelné sloučeniny, s výhodou působením dvojsodné soli kyseliny ethyléndiamintetraoctové v koncentraci 0,01 až 0,1 hmot.%.