



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

211239

(11) (B1)

(51) Int. Cl.³

A 61 K 39/395

(22) Přihlášeno 02 07 80
(21) (PV 4699-80)

(40) Zveřejněno 30 06 81

(45) Vydáno 15 06 84

(75)

Autor vynálezu

ŠTĚPÁNEK IVAN ing. CSc, ŠARIŠSKÉ MICHAĽANY

(54) Způsob přípravy koncentrovaných purifikovaných roztoků sérových imunoglobulinů skupiny G, A, M

Příprava koncentrovaných purifikovaných roztoků sérových imunoglobulinů skupiny G, A, M se týká diagnostické a terapeutické imunologie a je založena na tom, že při stacionárním zmrazení při -5°C až -50°C po dobu 2 až 24 hodin a stacionárním rozmrazení při $+5^{\circ}\text{C}$ až $+20^{\circ}\text{C}$ po dobu 2 až 48 hodin vzniká v roztoku imunoglobulinů skupiny G, A, M koncentrační gradient v důsledku čeho ve spodní části nádoby se bude nacházet zakonzentrovaný roztok, který se vypouští a dále zpracovává sterilní filtrací. Proces zmrazení a rozmrazení lze podle potřeby opakovat.

Purifikované imunoglobuliny skupiny G, A, M se rozpouští v apyrogenní vodě na koncentraci bílkovin $8 \pm 2\%$ při hodnotě pH 4,0 až 8,0. Po odstranění nízkomolekulárních sloučenin z imunoglobulinového roztoku skupiny G, A, M pomocí průtokové dialysy anebo gelové filtrace proti 0,1 až 1,0 procentnímu roztoku chloridu sodného v destilované apyrogenní vodě o teplotě 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$ se provádí jeho sterilizace filtrací a naplnění kolony je možné do 75 % objemu.

Vynález se týká způsobu přípravy koncentrovaných purifikovaných roztoků sérových imunoglobulinů skupiny G, A, M.

Imunoglobulinové preparáty skupiny G, A, M začínají být v současnosti široce používány zejména v klinické terapeutické praxi. Současná technologická praxe přípravy imunoglobulinových preparátů skupiny G, A, M buď laboratorních anebo určených pro terapeutické účely se v převážné míře zakoncentrovává lyofilizací.

Metoda lyofilizace kladé velké nároky a náročné požadavky na výrobní zařízení, je značně drahá a vyžaduje nepřetržitou servisní pozornost. Navíc je potřeba konstatovat, že v přirozených podmínkách ekosféry naší planety se za fyziologických ba ani za patologických podmínek nevyskytují tak nízké hodnoty vakua ve spojení s teplotami, které se běžně užívají při lyofilizaci.

Technologický postup může taktéž část některých nízkomolekulárních sloučenin s biochemicko-fyziologickou aktivitou v roztoku imunoglobulinů skupiny G, A, M koncentračně obohatovat vzhledem k jejich koncentraci ve výchozí surovině, z které byly imunoglobuliny izolovány a jednak se zpravidla do imunoglobulinového roztoku zanáší nízkomolekulární anorganické nebo organické sloučeniny použité jako precipitans.

Odstraňování vody v průběhu lyofilizace má za následek zvyšování koncentrace imunoglobulinů skupiny G, A, M a všech v roztoku přítomných nízkomolekulárních látek a poměrně zvýšená teplota na konci mrazové sublimace je zdrojem aktivační energie dostačující na vytvoření nežádoucích interakcí těchto látek s molekulami imunoglobulinů skupiny G, A, M.

Koncentrace bílkovinných roztoků pomocí lyofilizace se sice celosvětově hojně používá, ale hledají se i jiné metody zakoncentrování bílkovinných roztoků založené jendak na vakuum oddestilování vody a prchavých součástí (Smith K. J., Watt J. C., Watson C. N., Mastenbroek G. G. A.: Vox Sang. 22, 120, 1972) a jednak na oddělování vody a nízkomolekulárních látek pomocí membránových systémů (Friendli H., Fournier E., Volk T., Kistler P.: Vox Sang. 33, 93, 1977).

Podstata způsobu výroby koncentrovaných purifikovaných roztoků sérových imunoglobulinů skupiny G, A, M spočívá v tom, že bílkovinný materiál obsahující purifikované imunoglobuliny skupiny G, A, M se rozpouští v takovém množství destilované apyrogenní vody o teplotě 0 °C až +6 °C, aby se hodnota koncentrace bílkovin nacházela v rozmezí 2 % až 5 % a hodnota pH mezi 4,0 až 8,0, odstranění nízkomolekulárních sloučenin se z imunoglobulinového roztoku skupiny G, A, M provede zejména pomocí průtokové dialyzy anebo gelové filtrace proti 0,1 až 1,0 procentnímu roztoku chloridu sodného v destilované apyrogenní vodě o teplotě 0 °C až +6 °C, imunoglobulinový roztok skupiny G, A, M se sterilizuje zejména filtrací vyznačující se tím, že sterilizovaný roztok imunoglobulinů skupiny G, A, M se vnese do vysterylizované mrazové koncentrační zpravidla kovové kolony, kterou zaplní až do 75 % objemu ve které se imunoglobulinový roztok skupiny G, A, M stacionárně zmrazí například na -5 °C až -50 °C po dobu 2 až 24 hodin a opět stacionárně rozmrazí například při +5 °C až +20 °C po dobu 2 až 48 hodin a potom se z kolony odebere zahuštěný roztok imunoglobulinů skupiny G, A, M o stanovené koncentraci, anebo se proces zmrazování a rozmrazování opakuje, potom se imunoglobulinový roztok skupiny G, A, M dále zpracovává například sterilní filtrací.

Vynález je dále objasněn na příkladech provedení jimiž jeho rozsah není ani omezen ani vyčerpán.

Příklady provedení

P ř í k l a d č . 1

Výchozí surovinou je bílkovinná pasta precipitátu imunoglobulinů skupiny G, A, M získaná způsobem podle Pejaudiera a spol. (Pejaudier L., Audran R., Steinbuch M.: Vox Sang. 23, 165, 1972).

Bílkovinný materiál se rozpouští v takovém množství apyrogenní destilované vody o teplotě 0 °C až +6 °C, aby hodnota koncentrace bílkovin se nacházela v rozmezí 2 až 5 %. Rozpouštění se urychluje mícháním. Po rozpouštění se imunoglobulinový roztok skupiny G, A, M vyčechří například filtrací.

V technologických poměrech jsou výše uvedené podmínky zpravidla zachovány tehdy když rozpouštíme 1 kg imunoglobulinové pasty ve 2 000 ml destilované apyrogenní vodě o teplotě 0 °C až + 6 °C. Hodnota pH takto vzniklého imunoglobulinového roztoku skupiny G, A, M bývá zpravidla mezi pH 4,0 až 8,0 a koncentrace bílkovin bývá mezi 2 až 5 %. Takto připravený roztok purifikovaných imunoglobulinů skupiny G, A, M se vyčechří například filtrací a nízkomolekulární sloučeniny se z imunoglobulinového roztoku skupiny G, A, M odstraní například gelovou filtrací anebo dialýzou proti 0,1 až 1,0 procentnímu roztoku chloridu sodného v destilované apyrogenní vodě o teplotě 0 °C až +6 °C.

Imunoglobulinový roztok skupiny G, A, M se po odstranění nízkomolekulárních látek podrobí sterilizaci například filtrací a umístí se do vysterilizované koncentrační aparatury.

Za optimální rozměry technologických mrazových koncentračních kolon se považují takové, kde průměr kruhové anebo uhlopříčka čtvercové nebo obdélníkové základní plochy kolony ku výšce kolony se pohybují v poměru 1 : 2 až 1 : 10.

Množství imunoglobulinového roztoku skupiny G, A, M vsazeného do kolony nemá překročit 75 % objemu mrazové koncentrační kolony. Přístup chladu má být orientován hlavně vertikálním směrem ze spodu k vrchu a až potom směrem horizontálním od vnějšku ku vnitřku. Vrchní část kolony má zamrzat poslední a umožnit kapalině vytlačované v důsledku zvětšování objemu, aby mohla vystoupit nezamrzlým středem.

Zmrazování se provádí například při -50 °C až -5 °C po dobu 2 až 24 hodin a rozmrazování při +5 °C až +20 °C po dobu 2 až 48 hodin. Namrazování a rozmrazování má být pomalé a plynulé přičemž kapalina zejména po rozmrazení se nesmí pohybovat nebo mechanicky míchat. Dobu potřebnou na zmrazení a rozmrazení je nutno pro každý konkrétní typ aparatury stanovit empiricky.

Pokud se nejedná o velmi objemné kolony lze zmrazení realizovat vložení kolony do mrazícího pultu a rozmrazování realizovat vyjmutím z mrazícího pultu a umístěním kolony do pokojové teploty. Velkoobjemové mrazové koncentrační kolony musí mít chladicí jakož i ohřívací potrubí stočeno hadovitě okolo kolony odspodu směrem k vrchu kolony.

Roztok imunoglobulinů skupiny G, A, M se po stacionárním rozmrazení vypouští z kolony po malých objemech například po 100 ml až 500 ml a vyhodnocuje se obsah bílkovin, například spektrofotometricky nebo refraktometricky a oddělí se ty konkrétní frakce kde koncentrace poklesla pod hranici našeho zájmu například pod 10 g imunoglobulinů skupiny G, A, M na litr.

Zakoncentrovaný roztok imunoglobulinů skupiny G, A, M se podrobí dalšímu zpracování jako například sterilní filtrací. V případě potřeby lze proces zakoncentrování opakovat.

P ř í k l a d č. 2

Výchozí surovinou může být bílkovinná pasta imunoglobulinů skupiny G, A, M izolovaná i pomocí jiných precipitačních sloučenin. Na precipitaci balastních bílkovin ze směsi imunoglobulinů skupiny G, A, M může být použit síran amonný a rivanol (Schwick H. G., Fischer J., Geiger H.: Progr. Immunobiol. Standard 4, 86, 1970; Schwick H. G.: Vox Sang 23, 82, 1972), kyselina boritá (Pejaudier L., Audran R., Steinbuch M.: Vox Sang. 23, 165, 1972) a kyselina kaprylová (Blatrix C., Israël J., Reinert Ph., Griscelli C., Steinbuch M.: La nouvelle Presse Médicale 5, 1 193, 1976).

Bílkovinný materiál se rozpouští v takovém množství apyrogenní vody zpravidla destilované o teplotě 0 °C až +6 °C, aby hodnota koncentrace bílkovin se nacházela v rozmezí 2 až 5 %. Rozpuštění se urychluje mícháním. Po rozpuštění se imunoglobulinový roztok skupiny G, A, M vyčeří například filtrací, roztok imunoglobulinů skupiny G, A, M se zpracovává v dalším postupu jako v příkladě č. 1.

V případě, že by spodní výtokový otvor na vypouštění zakonzentrovaného roztoku imunoglobulinů skupiny G, A, M nemohl být otevřen lze zakonzentrovaný roztok imunoglobulinů skupiny G, A, M odsávat vrchem kolony. Odsávání se provádí pomocí tenké skleněné trubice, která se opatně ponoří až na dno nádoby, na kterou je napojená například gumová hadice s možností připejení na vakuum.

Účinnost zakonzentrování lze demonstrovat na tomto případě. Při zakonzentrování 3 litrů roztoku imunoglobulinů skupiny G, A, M o výchozí koncentraci 10 g na litr byl po prvním zmrazení a rozmrazení získán roztok, který po vypuštění po jednotlivých frakcích a 50 ml vykazoval tento koncentrační gradient.

Ve frakci č. 1 bylo stanoveno 36 g imunoglobulinů G, A, M na litr
Ve frakci č. 5 bylo stanoveno 27 g imunoglobulinů G, A, M na litr
Ve frakci č. 10 bylo stanoveno 20 g imunoglobulinů G, A, M na litr
Ve frakci č. 15 bylo stanoveno 15 g imunoglobulinů G, A, M na litr
Ve frakci č. 20 bylo stanoveno 11 g imunoglobulinů G, A, M na litr

Konzentrace ve frakcích 21 až 60 byla pod 10 g imunoglobulinů skupiny G, A, M na litr t.j. pod hranici našeho zájmu.

Při zakonzentrování 3 litrů roztoku imunoglobulinů skupiny G, A, M o výchozí koncentraci 10 g na litr byl po dvojnásobném zmrazení a rozmrazení získán roztok, který po vypuštění po jednotlivých frakcích a 50 ml vykazoval tento koncentrační gradient.

Ve frakci č. 1 bylo stanoveno 58 g imunoglobulinů G, A, M na litr
Ve frakci č. 5 bylo stanoveno 35 g imunoglobulinů G, A, M na litr
Ve frakci č. 10 bylo stanoveno 20 g imunoglobulinů G, A, M na litr
Ve frakci č. 15 bylo stanoveno 13 g imunoglobulinů G, A, M na litr
Ve frakci č. 20 bylo stanoveno 8 g imunoglobulinů G, A, M na litr

Konzentrace ve frakcích 21 až 60 byla pod 8 g imunoglobulinů skupiny G, A, M na litr t.j. mnohem níže než je hranice našeho zájmu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy koncentrovaných roztoků sérových imunoglobulinů skupiny G, A, M spočívající v tom, že bílkovinný materiál obsahující purifikované imunoglobuliny skupiny G, A, M se rozpouští v takovém množství destilované apyrogenní vody o teplotě 0 °C až +6 °C, aby se hodnota koncentrace bílkovin nacházela v rozmezí 2 až 5 % a hodnota pH mezi 4,0 až 8,0, odstranění nízkomolekulárních sloučenin se z imunoglobulinového roztoku skupiny G, A, M provede zejména pomocí průtokové dialyzy anebo gelové filtrace proti 0,1 až 1,0 procentnímu roztoku chloridu sodného v destilované apyrogenní vodě o teplotě 0 °C až +6 °C, imunoglobulinový roztok skupiny G, A, M se sterilizuje zejména filtrací vyznačující se tím, že sterilizovaný roztok imunoglobulinů skupiny G, A, M se vnese do vysterylizované mrazové koncentrační zpravidla kovové kolony, kterou zaplní až do 75 % objemu ve které se imunoglobulinový roztok skupiny G, A, M stacionárně zmrazí například při -5 °C až -50 °C po dobu 2 až 24 hodin a opět stacionárně rozmrazí například při +5 °C až +20 °C po dobu 2 až 48 hodin a potom se z kolony odebere zahuštěný roztok imunoglobulinů skupiny G, A, M o stanovené koncentraci, anebo se proces zmrazování a rozmrazování opakuje, potom se imunoglobulinový roztok skupiny G, A, M dále zpracovává například sterilní filtrací.