



ÚRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

247303

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
A 61 K 39/395

(22) Prihlásené 21 08 84
(21) (PV 6301-84)

(40) Zverejnené 15 05 86

(45) Vydané 15 01 88

(75)

Autor vynálezu

ŠTĚPÁNEK IVAN ing. CSc., ŠARIŠSKÉ MICHALANY

(54) Spôsob prípravy krvného zmesného imunoglobulínového preparátu

1

Vynález sa týka spôsobu prípravy zmesného imunoglobulínového preparátu na báze IgG + IgA + IgM

z normálnej alebo hyperimúnej plazmy, prípadne z normálneho alebo retrop'acentárneho, prípadne hyperimúneho séra, ktorý je určený pre terapeutické účely cestou intramuskulárnej alebo intravenózneho aplikácie.

Až doposiaľ sa realizuje príprava zmesného imunoglobulínového preparátu na báze IgG + IgA + IgM

pre terapeutické účely prevažne podľa kritérií pre intramuskulárne podanie, t. j. kladie sa dôraz na výťažnosť a na obsah látok so schopnosťou vyvolať pyretickú reakciu.

Na precipitáciu balastných bielkovín zo zmesi imunoglobulínov

IgG + IgA + IgM

bol použitý síran amónny a rivanol (Heide K., Haupt H.: Behringwerke Mitteil. 43, 161, 1964; Schwick H. G., Fischer J., Geiger H.: Progr. Immunobiol. Stand. 4, 86, 1970; Schwick H. G.: Vox Sang. 23, 82, 1972), kyselina boritá (Pejaudier L., Audran P., Steinbuch M.: Vox Sang. 23, 165, 1972) a kyselina kaprylová (Audran R., Pejaudier L., Steinbuch M.: Rev. Franc. Transf. Immunol. Hematol. 18, 119, 1975; Blatrix G., Israel J., Reinert Ph., Griscelli G., Steinbuch M.: La

2

Nouvelle presse Medicale 5, 1193, 1976).

Súčasná technologická prax na jednej strane síce oddeľuje zmesný imunoglobulínový preparát na báze

IgG + IgA + IgM

od zmesi iných krvných bielkovín, ale na druhej strane zanáša do roztoku

IgG + IgA + IgM

nízkomolekulárne anorganické alebo organické zlúčeniny. Technologický postup môže taktiež časť niektorých zlúčenín s biochemicko-fyziologickou aktivitou v roztoku zmesného imunoglobulínového preparátu koncentrovať, t. j. obohacovať vzhľadom ku ich koncentrácii vo východzej surovine, z ktorej boli imunoglobulíny

IgG + IgA + IgM

izolované.

Princíp odstraňovania nízkomolekulárnych látok s využitím dialýzy oproti destilovanej apyrogénnej vode bol použitý u albumínu (Štěpánek I., Uhrík J.: AO 208 866) ako aj u gama globulínu (Štěpánek I., AO číslo 244 306). Odstraňovanie nízkomolekulárnych látok s využitím dialýzy oproti 0,1% až 3,0 %-nému vodnému roztoku chloridu sodného bolo použité u gama globulínu (Štěpánek I., Uhrík J.: AO 208 868) ako aj u zmesného imunoglobulínového preparátu na báze

IgG + IgA + IgM

(Štěpánek I., Uhrík J.: AO 208 867).

Zmesný imunoglobulínový preparát na báze

IgG + IgA + IgM,

pripravený podľa doposiaľ platných kritérií pre intramuskulárne podanie má dokázateľný hypotenzívny a antikomplementárny účinok, čo je pre kvalitu intravenózneho preparátu neprípustné. Podanie preparátov týchto kvalít intravenózne môže v dôsledku náhlého poklesu krvného tlaku pacienta ohroziť a v dôsledku antikomplementárnej aktivity oslabiť jeho nešpecifickú obranu.

Na odstraňovanie antikomplementárnej aktivity gama globulínu, ktorý bol pripravený zo zmesi plazmatických alebo sérových bielkovín, bola použitá úprava hodnoty pH na 4,0 pri 24 hodinovej inkubácii pri 37 °C [Barandun S., Kistler P., Jeunet F., Isliker H.: Vox Sang. 7, 157, 1962].

Pokles antikomplementárnej aktivity gamaglobulínu bol zaznamenaný po pridaní aktívneho uhlia [Steinbuch M., Audran R., Amouch P., Blatrix C.: Vox Sang. 13, 103, 1967], po pridaní trikalciumpfosfátu [Steinbuch M., Audran R., Amouch P., Blatrix C.: Rev. med. Tours, suppl. No 3, 79, 1968] a po pridaní albumínu [Auerswald W., Kiese wetter E.: Wien. med. Wschr. 115, 690, 1965].

Znižovanie antikomplementárnej aktivity gama globulínového roztoku pomocou proteolytického štiepenia bolo realizované pepsínom [Schultze H. E., Schwick G.: Dtsch. med. Wschr. 87, 1643, 1962] a plazmínom [Sgouris J. T.: Vox Sang. 13, 71, 1967].

Antikomplementárnu aktivitu gama globulínovej molekuly je možné znížiť jej chemickou redukciou beta merkaptotanolom [Wiederman G., Miescher P. A., Franklin E. C.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 113, 609, 1963], modifikáciou betapropiolaktonom [Stephan W.: Z. klin. Chem. 7, 282, 1969; Stephan W.: Vox Sang. 28, 422, 1975], redukciou s dithioerythritolom [Isenman D. E., Dorrington K. J., Painter R. H.: J. Immun. 114, 1726, 1975], sulfonáciou [Masuho Y., Tomibe K., Matsuzawa K., Ohtsu A.: Vox Sang. 32, 175, 1977], amidáciou [Schmidtberger R.: US Patent No 4 118 379 [1978]], redukciou s dithioethritolom a alkyláciou s jodacetamidom [Fernandes P. M., Lundblad J. L.: Vox Sang. 39, 101, 1980] a redukciou s dithioethritolom v kombinácii s dithioerythritolom s následnou alkyláciou pomocou jodacetamidu alebo metyljodidu, akrylonitrilu, benzylbromidu, prípadne etylénoxidu [Schroeder D. D., Tankersley D. L., Lundblad J. L.: Vox Sang. 40, 373, 1981].

Antikomplementárna aktivita zmesného imunoglobulínového preparátu na báze

IgG + IgA + IgM

súvisí pravdepodobne so vznikom polymérov

IgG + IgA + IgM,

ktoré môžu vznikať v procese technologickej izolácie a jednak v procese lyofilizácie ako dôsledok interakcie nízkomolekulár-

ných látok s molekulami IgG, IgA a IgM.

Použitie destilovanej apyrogénnej vody pri separácii nízkomolekulárnych zlúčenín zo zmesného imunoglobulínového preparátu na báze

IgG + IgA + IgM

spôsobuje precipitáciu pravdepodobne polymérov IgG, IgA a IgM a jednak odstránenie nízkomolekulárnych látok, do ktorých môžeme zahrnúť aj zlúčeniny s hypotenzívnou aktivitou, v dôsledku čoho pri lyofilizácii nemôže dôjsť ku ich interakcii s molekulami IgG, IgA a IgM, čiže nedochádza ani ku polymerizácii, to znamená, že ani ku vzniku antikomplementárnej aktivity.

Antikomplementárna aktivita bola testovaná na základe úbytku aktivity komplementu. Úbytok známej hodnoty aktivity komplementu po pridaní známeho množstva roztoku lyofilizovaného zmesného imunoglobulínového preparátu na báze

IgG + IgA + IgM

bol stanovený metódou podľa Kabáta a Mayera [Kabát E. A., Mayer M. M.: Experimentální Imunochemie Praha ČSAV 1965 str. 180].

Efekt destilovanej apyrogénnej vody pri separácii antikomplementárnej aktivity je možné dokumentovať u 10 experimentálnych šarží zmesného imunoglobulínového preparátu na báze

IgG + IgA + IgM,

kde bolo dosiahnuté zníženie antikomplementárnej aktivity u lyofilizovaného zmesného imunoglobulínového preparátu na báze

IgG + IgA + IgM

o 90 až 98 % v porovnaní s tým istým materiálom, ktorý bol lyofilizovaný bez predchádzajúcej separácie nízkomolekulárnych zlúčenín.

Hypotenzívny účinok bol testovaný na základe poklesu krvného tlaku kráľíka priamou krvnou metódou podľa ČSL 3 (ČSL 3, sväzok I, vydanie III, Avicenum Praha str. 149) s tým, že kráľíkovi o hmotnosti 2 až 3 kg sa aplikujú 2 ml zmesného imunoglobulínového preparátu na báze

IgG + IgA + IgM

na kg hmotnosti. Obsah bielkovín v aplikovanom zmesnom imunoglobulínovom preparáte na báze

IgG + IgA + IgM

je 15 g na 1 000 ml roztoku. U preparátov pripravených podľa navrhovaného postupu sa hypotenzívna aktivita nevyskytovala v tak výraznej intenzite, čo je možné dokumentovať údajom, že z 10 pripravených experimentálnych šarží podľa predloženého výsledku bol stanovený pokles systolického tlaku maximálne o 4 až 8 % v porovnaní s tým istým materiálom v tej istej dávke bez separácie nízkomolekulárnych zlúčenín, kde bol stanovený pokles systolického tlaku od 20 do 30 %.

Podstatou výsledku je odstránenie nízkomolekulárnych zlúčenín zo zmesného roztoku

IgG + IgA + IgM

prietokovou dialýzou oproti destilovanej apyrogénnej vode, pričom pri použití cca 300 násobného objemu vody ako je objem dialyzovaného roztoku dôjde ku precipitácii časti imunoglobulínov, pravdepodobne po'ymerých foriem IgG, IgA a IgM, ktoré vyprecipitujú v podobe sedimentu a predstavujú zdroj IgM. Roztok po oddelení sedimentu predstavuje zmesný imunoglobulínový preparát na báze

IgG + IgA + IgM

so zníženým hypotenzívnym a antikomplementárnym účinkom.

Bielkovinný materiál obsahujúci purifikovaný

IgG + IgA + IgM

sa suspenduje za aseptických podmienok v takom množstve apyrogénnej destilovanej vody o teplote 0 °C až +6 °C, aby hodnota koncentrácie bielkovín sa nachádzala v rozmedzí 1 % až 15 %, s optimom 8 ± 2 %, roztok imunoglobulínov sa vyčirí, napríklad filtráciou a separácia nízkomolekulárných zlúčenín sa prevádza z roztoku imunoglobulínov prietokovou dialýzou oproti destilovanej apyrogénnej vode s hodnotou pH v rozmedzí 4,0 až 8,0 pri prietoku 300 ml až 2 000 ml za minútu po dobu 24 až 72 hodín.

Po ukončení dialýzy sa z dialyzačného potrubia oddialyzovaný roztok imunoglobulínov vyleje a vzniklý sediment sa odstráni napríklad filtráciou alebo centrifugáciou. Roztok imunoglobulínov sa prípadne zakoncentrováva ultrafiltráciou, podrobí sa sterilizácii napríklad filtráciou alebo radiačnou sterilizáciou, rozplňuje sa, lyofilizuje a v prípade potreby sa podrobí ďalšiemu spracovaniu.

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

Príklady prevedenia

Príklad 1

Východnou surovinou môže byť bielkovinná pasta zmesného imunoglobulínového preparátu na báze

IgG + IgA + IgM

získaná napríklad spôsobom podľa Pejaudiera a spol. [Pejaudier L., Audran R., Steinbuch M.: Vox Sang. 23, 165, 1972]. Bielkovinný materiál vyprecipitovaných imunoglobulínov sa rozpúšťa v takom množstve destilovanej apyrogénnej vody o teplote 0 °C až +6 °C, aby hodnota koncentrácie bielkovín sa nachádzala v rozmedzí 1 až 15 %, s optimom 8 ± 2 %. Rozpúšťanie sa urýchľuje miešaním. Po rozpustení sa roztok imunoglobulínov na báze

IgG + IgA + IgM

vyčirí filtráciou.

V technologických pomeroch sú vyššie uvedené podmienky spravidla zachované

vtedy, keď rozpúšťame 1 kg bielkovinnej pasty imunoglobulínov skupiny

IgG + IgA + IgM

v 2 000 ml apyrogénnej destilovanej vody o teplote 0 °C až +6 °C. Hodnota pH takto vzniknutého roztoku imunoglobulínov býva spravidla medzi 4,0 až 8,0 a koncentrácia bielkovín v rozmedzí 8 ± 2 %. Takto starostlivo pripravený roztok sa vyčirí napríklad filtráciou a nízkomolekulárne zlúčeniny sa odstraňujú z roztoku prietokovou dialýzou cez dialyzačné potrubie. Dialyzačné potrubie môže byť vyrobené z celofánových, kolódiových, vinylpolymérnych membrán, prípadne z iných materiálov.

Namočené dialyzačné potrubie v apyrogénnej destilovanej vode sa nechá nabobtnať a potom sa naplní destilovanou apyrogénnou vodou za účelom preverenia celistvosti. Priemer dialyzačného potrubia by sa mal pohybovať od 2 cm do 15 cm s optimom 5 cm. Sterilizácia dialyzačného potrubia sa prevádza v roztoku destilovanej apyrogénnej vody, napríklad autoklavovaním pri 122 °C po dobu 40 minút, alebo chemickou cestou, napríklad etylénoxidom. Spodná časť dialyzačného potrubia sa uzavrie uzlom. Roztok zmesného imunoglobulínového preparátu na báze

IgG + IgA + IgM,

sterilizovaný napríklad filtráciou, sa naleje do vysterylizovaného dialyzačného potrubia, uzatvoreného v spodnej časti uzlom a uzavrie sa vo vrchnej časti uzlom so slučkou, za ktorú sa zavesí na vrchné víko dialyzačnej prietokovej kolóny.

Za optimálne rozmery technologických dialyzačne prietokových kolón sa považujú také, kde priemer kruhovej alebo uhlopriečka štvorcovej, prípadne obdĺžnikovej základnej plochy ku výške kolóny sa pohybuje v pomere 1 : 5 až 1 : 10. Množstvo roztoku zmesného imunoglobulínového preparátu vloženého do dialýzy nemá prekročiť 25 až 30 % objemu prázdnej kolóny.

Po nanesení zvoleného objemu roztoku zmesného imunoglobulínového preparátu na báze

IgG + IgA + IgM

sa zahájí nútený prietok apyrogénnej destilovanej vody o teplote 0 °C až +6 °C o pH 4,0 až 8,0 pri prietoku 300 ml až 2 000 ml za minútu, s výhodou pri prietoku 1 000 ml za minútu po dobu 72 hodín. Množstvo celkovo pretečenej destilovanej apyrogénnej vody má byť minimálne 300 násobkom objemu zmesného imunoglobulínového roztoku, ktorý bol umiestnený do vnútra dialyzačného potrubia.

Pri penetrácii nízkomolekulárných zlúčenín z roztoku zmesného imunoglobulínového preparátu cez dialyzačnú membránu odchádzajú aj nízkomolekulárne zlúčeniny spôsobujúce hypotenzívny účinok v dôsledku odchodu nízkomolekulárných zlúčenín cez stenu dialyzačnej membrány klesá

stabilita a tým aj rozpustnosť, pravdepodobne časti polymérov IgG, IgA a IgM, ktoré začnú vypadávať v podobe suspenzie až sedimentačného precipitátu a z roztoku spravidla sa usadila v dolnej časti potrubia. Sediment precipitátu sa spravidla objaví cca po 40 hodine priebehu dialýzy. Nachádzajú sa v ňom bielkoviny, ktoré sú zodpovedné za prevažnú časť antikomplementárnej aktivity.

Po skončení dialýzy sa dialyzačné potrubie zavesí so závesného háčika na vrchom veku dialyzačnej kolóny, opatrne sa vyberie z kolóny a po rozstrihnutí sa roztok oddelí od sedimentu a podrobí sa sterilnej filtrácii, pričom dôjde ku definitívnemu oddeleniu zvyškov sedimentu z roztoku, roztok sa podrobí zakoncentrovaniu pomocou

ultrafiltrácie, vymrazovaním, alebo vákuovej destilácii, rozplňuje sa a lyofilizuje a v prípade potreby sa podrobí ďalšiemu spracovaniu.

Príklad 2

Východnou surovinou môže byť bielkovinná pasta zmesného imunoglobulínového preparátu

IgG + IgA + IgM

alebo ich roztok izolovaný aj pomocou iných metód. Bielkovinná pasta alebo roztok imunoglobulínov na báze

IgG + IgA + IgM

sa spracováva v ďalšom postupe ako v príklade č. 1.

PREDMET VYNÁLEZU

1. Spôsob prípravy krvného zmesného imunoglobulínového preparátu na báze

IgG + IgA + IgM

so zníženým hypotenzívnym a antikomplementárnym účinkom spočívajúci v tom, že bielkovinný materiál obsahujúci imunoglobulíny

IgG + IgA + IgM

sa suspenduje za aseptických podmienok v takom množstve apyrogénnej destilovanej vody o teplote 0 °C až +6 °C, aby hodnota koncentrácie bielkovín bola v rozmedzí 1 % až 15 %, roztok imunoglobulínov sa vyčirí napríklad filtráciou a odstránia sa nízkomolekulové látky o molekulárnej hmotnosti do 50 000, vyznačujúci sa tým, že nízkomolekulové látky sa odstraňujú prietokovou dialýzou oproti destilovanej apyrogénnej vode, o teplote 0 °C až 6 °C, pri pH 4,0 až 8,0, pri prietoku 300 ml až 2 000 ml za minútu, po dobu 24 až 72 hodín, pri objemovom množstve pretečenej vody minimálne 300 násobne väčšom ako je objem zmesného imunoglobulínového roztoku, pričom oddialyzovaný roztok

IgG + IgA + IgM

sa ďalej spracováva a bielkovinový precipitát

IgG + IgA + IgM

predstavuje zdroj IgM.

2. Spôsob prípravy podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že dialýza prebieha v dialy-

začnom potrubí, zhotovenom najmä z celofánových, kolódiových alebo vinylpolymérových membrán.

3. Spôsob prípravy podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že dialyzačné potrubie sa pred dialýzou sterilizuje autoklávaním alebo chemickou cestou.

4. Spôsob prípravy podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že zmesný roztok

IgG + IgA + IgM

sa pred dialýzou sterilizuje filtráciou.

5. Spôsob prípravy podľa bodu 1 vyznačujúci sa tým, že materiál, z ktorého sa frakcia obsahujúca

IgG + IgA + IgM

izoluje, je normálna alebo hyperimúnná plazma, prípadne normálne, retroplacentárne alebo hyperimúnné sérum s definovanou antibakteriálnou, antitoxickou alebo antivírusovou protilátkovou aktivitou.

6. Spôsob prípravy podľa bodu 1 vyznačujúci sa tým, že roztok

IgG + IgA + IgM

zbavený nízkomolekulárných látok a sedimentačného precipitátu sa ďalej spracováva napríklad sterilnou filtráciou, podrobí sa prípadnému zakoncentrovaniu pomocou ultrafiltrácie, vymrazovaním alebo vákuovou destiláciou, rozplňuje sa, lyofilizuje a v prípade potreby sa podrobí ďalšiemu spracovaniu.