



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

237930
(11) (E3)

(61) Autorské osvědčení je závislé
na autorském osvědčení č. 237 620

(22) Přihlášeno 01 09 83

(21) [PV 6302-33]

(51) Int. Cl.⁴
A 23 J 1/06
A 23 J 1/00

(40) Zveřejněno 31 03 84

(45) Vydáno 15 03 87

(75)
Autor vynálezu

POKORNÝ MILOŠ prom. chem. CSc., BENEŠ MILAN ing. CSc., PRAHA,
HOLINKA MILAN dipl. chem., VYŽICE (ČSSR),
POMMERENING KLAUS dr., BERLIN (NDR),
ULRYCH STANISLAV RNDr., PRAHA (ČSSR)

(54) Způsob izolace sérového albuminu na sférickém makroporézním
celulózovém afinitním sorbentu

1

2

Vynález se týká izolace sérového albuminu na modrém celulózovém sorbentu.

Podstatou vynálezu je způsob izolace sérového albuminu na sférickém makroporézním celulózovém afinitním sorbentu s navázanou reaktivní modří 2 podle čs. AO č. 237 620, vyznačený tím, že se albumin izoluje z frakcí získaných při frakcionaci krevního séra ethanolovou srážecí metodou nebo ionexovou chromatografií tak, že se albumin z roztoku bílkovin zachytí během průtoku sloupcem nebo rozmíchávání suspenze při pH 7,0 až 8,5 a iontové síle odpovídající 0,01 až 0,05 M roztoku chloridu sodného a uvolní se z vazebného komplexu elucí vhodným roztokem o vyšší iontové síle s výhodou 1 M až 6 M roztokem chloridu sodného v octanovém pufru pH až 4,8.

Způsob podle vynálezu je dále vyznačen tím, že se čistý albumin získává z mezifrakce IV—V ethanolové frakcionace. S výhodou lze podle vynálezu albumin izolovat i z ostatních globulinových frakcí.

Vynález se týká izolace sérového albuminu na modrém celulóзовém sorbentu.

Pro frakcionaci bílkovin krevního séra je vypracována již řada postupů (Allen P. C., Hill E. A., Stokes A. M.: *Plasma Proteins, Analytical and Preparative Techniques* (1977), Curling J. M.: *Methods of Plasma Protein Fractionation* (1980)). K izolaci bílkovin pro terapeutické a profylaktické účely ve výrobním měřítku se však stále nejčastěji používají postupy založené na ethanolové frakcionaci vypracované Cohnem (Cohn E. J. a spol.: *J. Am. Chem. Soc.* 68, 459 (1946)). Teprve v poslední době se i na tomto poli začínají prosazovat metody chromatografické.

Ionexové chromatografie se například používá při přípravě albuminu a globulinu jako hlavní purifikační krok nebo při zlepšování čistoty a stability u frakcí získaných většinou srážecími postupy (Curling J. M.: *Methods of Plasma Protein Fractionation*, str. 77 až 158 (1980)). Používá se přitom většinou také gelová filtrace. Zjištění, že za vhodných podmínek dochází k selektivní interakci sérového albuminu s reaktivní modří 2 (Cibachronová modř 3G-A, Procionová modř H, Ostazinová modř H-3G) navázanou na nosiči (Travis J., Panell R.: *Clin. Chim. Acta* 49, 49 (1973)), vyvolalo zájem využít tohoto chování pro izolaci albuminu (pseudo)afinitní chromatografií (dye-ligand chromatography) (Saint-Blancard J., Kirzin J. M., Riberon P., Petit F.: v *Affinity Chromatography and Related Techniques*, ed. Gribnau T. C. J., Visser J., Nivard R. J. F.-Elsevier 1982 — str. 305).

Rozhodující roli hraje struktura barviva, jeho koncentrace a způsob navázání. Z aplikačního hlediska je důležitý také nosič, který určuje dostupnost funkčních skupin při sorpci a desorpci, a jeho nespecifické sorpce. Jako nosiče pro přípravu modrých afinantních sorbentů se dosud používají nejčastěji polysacharidy dextranového nebo agarózového typu a nověji také syntetické polymery methakrylátového typu.

Tradiční formy celulózy poskytly modré deriváty s vazbou albuminu pro praktické účely nepostačující (Angal S., Dean P. D. G.: *Biochem. J.* 167, 301 (1977)). Tento nedostatek se odstraní použitím sférické regenerované makroporézní celulózy jako výchozího materiálu. Modré deriváty na této bázi jsou ve srovnání s dextranovými nebo agarózovými mechanicky pevnější, mají lepší tokové vlastnosti i při práci v koloně s vysokým sloupcem, jejich objem se při změnách pH a iontové síly prakticky nemění. To spolu s lepší dostupností umožňuje použití i ve výrobním měřítku. Byly použity pro separaci a izolaci albuminu z krevního séra (Pommerening K., Jobsky D., Beneš M., Štamberg J.: *Čs. AO* č. 237 620).

Podstata způsobu izolace sérového albuminu na sférickém makroporézním celulóзовém afinantním sorbentu s navázanou

reaktivní modří 2 podle čs. AO č. 237 620 spočívá podle vynálezu v tom, že se albumin izoluje z frakcí získaných při frakcionaci krevního séra ethanolovou srážecí metodou nebo ionexovou chromatografií tak, že se albumin z roztoku bílkovin zachytí během průtoku sloupcem uvedeného roztoku nebo rozmíchávání suspenze roztoku albuminu a uvedeného sorbentu, přičemž roztok albuminu má pH 0,7 až 8,5 a iontovou sílu odpovídající 0,01 až 0,05 M roztoku chloridu sodného a sérový albumin se z vazebného komplexu uvolní elucí vhodným roztokem o vyšší iontové síle, s výhodou 1 M až 6 M roztokem chloridu sodného v octanovém pufru pH 5,6 až 4,8.

Způsob podle vynálezu je dále vyznačen tím, že se čistý albumin získává z mezifrakce IV—V ethanolové frakcionace. S výhodou lze podle vynálezu albumin izolovat z ostatních globulinových frakcí.

Výhodou způsobu izolace sérového albuminu podle vynálezu je zvýšení výtěžnosti při výrobě čistého albuminu z dárcovské krevní plazmy nebo náhradních surovin použitím kombinace klasického postupu frakcionace s (pseudo)afinitní chromatografií. Čistý albumin odpovídající požadavkům lékopisu se tak získává z mezifrakce IV—V ethanolové frakcionace podle Cohna, z globulinové frakce nebo z odpadní kapaliny po oddělení imunoglobulinové frakce. Odstraněním albuminu ze surového gama globulinu se získá produkt o vyšší elektroforetické čistotě.

Příklad 1

Přes sloupec sférické celulózy (výška 35 centimetrů, průměr 1,35 cm) s vázaným afinantem reaktivní modří 2 — color index 61 211 (Cibachronová modř) (3,6 μ mol barviva/mol mokrého nosiče) ekvilibrovaného 0,05 M roztokem chloridu sodného, volně protékal 8 % roztok bílkovin obsahující 94 procent gamaglobulinu, 1 % alfa a beta globulinu a 5 % albuminu, který vznikl při provádění ethanolové frakcionaci krevního séra podle Cohnovy metody. Iontová síla odpovídala 0,08 M roztoku chloridu sodného.

Hodnota pH byla upravena na 7,2 až 7,5. Osvědčil se poměr 100 ml roztoku bílkovin na 50 ml sorbentu. Po protečení celého množství roztoku bílkovin byl sloupec promýván 0,05 molárním roztokem chloridu sodného pokud eluát obsahoval bílkoviny. Takto získaný roztok gamaglobulinu, zbavený příměsí albuminu byl dále zpracován známým způsobem.

Sorbent byl regenerován promytím 3,5 molárním roztokem chloridu sodného a ekvilibrován 0,05 M roztokem chloridu sodného. Po několika těchto cyklech byl sorbent ještě regenerován po promytí 3,5 molárním roztokem chloridu sodného způsobem.

bem známým z regenerace iontoměničů za užití 0,2 M kyseliny chlorovodíkové a 0,1 M hydroxidu sodného. Potom byl sorbent ekvilibrován 0,05 M roztokem chloridu sodného.

Příklad 2

Přes sloupec sorbentu uvedeného v příkladu 1, který byl ekvilibrován 0,05 M roztokem chloridu sodného, volně protékal 2% vodný roztok plazmatických bílkovin obsahující 80 % albuminu, který vznikl rozpuštěním mezifrakce IV—V ethanolové frakcionace podle Cohnovy metody nebo jako frakce při dělení směsi bílkoviny na iontoměniči. Hodnota pH roztoku byla upravena na 8,0 až 8,5 a iontová síla roztoku odpovídala 0,05 M roztoku chloridu sodného.

Osvědčil se poměr 100 ml roztoku na 130 až 150 ml sorbentu. Po ukončení aplikace celého množství bílkovin byl sloupec promýván roztokem 0,05 M chloridu sodného dokud protékala nezachycená bílkovina. Tato vytékající tekutina neobsahovala albumin, nebo jej obsahovala značně snížené množství. Potom byl zachycený albumin desorbován promýváním sloupce 3,5 M roztokem chloridu sodného. Eluce probíhala tak dlouho, pokud se ze sorbentu uvolňovala bílkovina. Získaný roztok sérového albuminu byl dále zbaven nadbytečného množství solí, zahuštěn a dále zpracován známým způsobem.

Příklad 3

Přes sloupec sorbentu uvedeného v příkladu 1, který byl ekvilibrován 0,05 M roztokem chloridu sodného, volně protékal roztok bílkovinné mezifrakce ethanolové frakcionace podle Cohnovy metody obsahující 19 % ethanolu a 2 % bílkovin, po oddělení frakce I—II—III. Hodnota pH roztoku byla upravena na 8,0 až 8,5. Ioniová síla byla mezi 0,05 až 0,1. Aplikace ethanolového roztoku bílkovin byla provedena při teplotě 0 °C. Další postup promývání a desorpce

albuminu byl proveden stejně jako v příkladu 2.

Příklad 4

Přes sloupec sorbentu uvedeného v příkladu 1, který byl ekvilibrován 0,05 M roztokem chloridu sodného, protékal roztok odpadní tekutiny po oddělení imunoglobulinové frakce obsahující 0,2 % bílkovin, z nichž hlavní část tvořil albumin, a 25 % ethanolu. Hodnota pH roztoku byla upravena na 7,8 až 8,0; iontová síla byla 0,08. Aplikace roztoku probíhala při -1 °C. Další postup promývání a desorpce albuminu byl proveden stejně jako v příkladu 2.

Příklad 5

50 ml sférické celulózy s vázaným afinantem reaktivní modří 2 (Cibacronová modř), promyté destilovanou vodou, bylo suspendováno se 100 ml odpadní tekutiny, která vzniká po oddělení imunoglobulinové frakce ethanolové frakcionační metody podle Cohna, obsahující asi 0,2 % bílkovin, z nichž hlavní část tvořil albumin a která obsahuje 25 % ethanolu.

Hodnota pH byla u této tekutiny předem upravena na 7,8 až 8,5. Suspenze sorbentu s roztokem bílkovin byla míchána tak dlouho, až se obsah bílkovin podstatně snížil. Potom byl sorbent oddělen sedimentací nebo odfiltrován, tekutina byla likvidována a sorbent promyt roztokem 0,05 M chloridu sodného. Zachycený albumin byl ze sorbentu uvolněn pomocí 3,5 M roztoku chloridu sodného buď suspendací sorbentu a dekantací, nebo promýváním sloupce na filtru.

Příklad 6

Sérový albumin zachycený na sorbent podle příkladů 2 až 5 byl eluován vodným roztokem sestávajícím z 6 % chloridu sodného 1,6 % natrium oktanoátu (kaprylanu sodného) a 10 % ethanolu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob izolace sérového albuminu na sférickém makroporézním celulóзовém afinitním sorbentu s navázanou reaktivní modří 2 podle čs. AO č. 237 620, vyznačený tím, že se albumin izoluje z frakcí získaných při frakcionaci krevního séra etanolovou srážecí metodou nebo ionexovou chromatografií zachycením během průtoku roztoku albuminu sloupcem uvedeného sorbentu nebo rozmícháváním suspenze roztoku albuminu a uvedeného sorbentu, přičemž roztok albuminu má pH 7,0 až 8,5 a iontovou sílu odpovídající 0,01 až 0,05 M roztoku chloridu sodného a sérový albumin se z vazebného komplexu uvolní elucí vhodným roztokem o vyšší iontové síle, s výhodou 1 M až 6 M

roztokem chloridu sodného v octanovém pufru opH 5,6 až 4,8.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se čistý albumin získává z mezifrakce IV až V ethanolové frakcionace.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se albumin odstraňuje z globulinové frakce ethanolové frakcionace.

4. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se albumin izoluje z odpadní tekutiny vzniklé po oddělení imunoglobulinové frakce ethanolové frakcionace.

5. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se albumin izoluje z frakce IV — 1,4 ethanolové frakcionace.