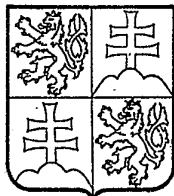


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATÍVNA
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNY ÚRAD
PRE VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENIU

272 716

(21) PV 7098-87.J
(22) Prihlášené 02 10 87

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵
A 61 K 39/395

(40) Zverejnené 13 06 90
(45) Vydané 25 11 91

(75) Autor vynálezu ŠTĚPÁNEK IVAN ing.CSc., ŠARIŠSKÉ MICHAĽANY

(54)

Spôsob prípravy imunoglobulinových preparátov na báze IgG+IgA a IgG+IgM pre i.m. podanie z krvného zmesného imunoglobulinového preparátu na báze IgG+IgA+IgM

(57) Spôsob prípravy imunoglobulinových preparátov na báze IgG+IgA a IgG+IgM pre i.m. podanie z krvného zmesného imunoglobulinového preparátu na báze IgG+IgA+IgM. Bielkovinný roztok obsahujúci IgG+IgA+IgM o koncentrácii bielkovín 5 až 100 g na liter, s optimom 20 až 50 g na liter, sa precipituje 6 až 10 obj. % etanolu, vztiahnuté na celkový objem reakčnej zmesi, pri konečnej teplote - 5°C až - 12 °C, sediment sa nechá miešať alebo stáť za vyššie uvedených podmienok 5 až 12 hodín, následnou centrifugáciou sa suspenzia rozdelí na precipitát bohatý na IgG+IgM a na supernatant bohatý na IgG+IgA pričom u oboch preparátov sa upraví koncentrácia bielkovín na 20 až 50 g na liter, pridá sa chlorid sodný do koncentrácie 3 až 9 g na liter, pred koncovou lyofilizáciou sa roztoky stabilizujú prídanim glukózy, maltózy alebo iných cukrov, pH sa upraví na 6,4 až 7,4, v prípade potreby sa oba roztoky podrobia ďalšiemu spracovaniu napríklad pomocou gelovej, iontovej alebo afinitnej chromatografie, sterilizujú sa napríklad filtráciou, rozplňujú sa a lyofilizujú.

Vynález sa týka spôsobu prípravy imunoglobulinových preparátov na báze IgG+IgA a IgG+IgM pre i.m. podanie z krvného zmesného imunoglobulinového preparátu na báze IgG+IgA+IgM, ktorý bol pripravený z normálnej alebo hyperimunnej plazmy prípadne z normálneho, retroplacentárneho alebo hyperimunného séra s definovanou antibakteriálnou, antitoxickou alebo antivirovou protilátkovou aktivitou.

Na prípravu imunoglobulinových preparátov na báze IgG+IgA a IgG+IgM pre i.m. podanie použil Audran a spol. (Audran R., Pejaudier L., Steinbuch M.: Rev.Franc.Transf.Immunol.Hematol. 18,119,1975) kombinovanú metodu precipitácie na báze alkoholickéj frakcionácie spojenej s účinkom kyseliny kaprylovej, Wickerhauser a Hao (Wickerhauser M., Hao Y.L.: Vox Sang. 23,119,1972) použili polyetylenglykol za spoluúčasti zinočnatých solí a síranu amonného, pričom Schwick a spol. (Schwick H.G., Fischer J., Geiger H.: v knihe "Immunoglobulins, biological aspects and clinical uses" National Acad.Sciences Washington DC 1970, str.116) použili kombinovanú precipitačnú metodu na báze síranu amonného a rivanolu.

Podstatou spôsobu prípravy imunoglobulinových preparátov na báze IgG+IgA a IgG+IgM pre i.m. podanie je precipitácia bielkovinného roztoku na báze IgG+IgA+IgM etanolom, ktorý vyzráža z roztoku bielkovinný precipitát bohatý na IgG+IgM a v roztoku zostáva IgG+IgA pričom bielkovinný roztok na báze IgG+IgA+IgM o koncentrácii 5 až 100 gramov na liter, s optimom 20 až 40 gramov na liter, pri rozmedzí pH 4,0 až 8,0, s optimom 6,8-7,2, pri koncentrácii etanolu 6 až 10 obj.%, vztiahnuté na celkový objem reakčnej zmesi, pri konečnej teplote -5 °C až -12 °C z ktorého bol vyprecipitovaný sediment v podobe bielkovinného precipitátu sa mieša alebo necháva stáť pri uvedených podmienkach 5 až 12 hodín a potom sa prikročí ku oddeleniu precipitátu napríklad centrifugáciou pri teplote -5 °C až -12 °C.

Precipitát bohatý na IgG+IgM sa rozpúšťa v roztoku chloridu sodného v apyrogennej vode o teplote 0 °C až +6 °C na koncentraciu 3 až 9 gramov chloridu sodného na liter, hodnota pH sa upraví na 6,4 až 7,4, v prípade potreby sa podrobí ďalšiemu spracovaniu napríklad pomocou gelovej, iontomennej alebo afinitnej chromatografie, pričom pred koncovou lyofilizáciou sa roztok stabilizuje pridaním glukózy, maltózy alebo iných cukrov, sterilizuje sa napríklad filtráciou, rozplňuje sa a lyofilizuje.

Supernatant bohatý na IgG+IgA sa zbavuje etanolu napríklad lyofilizáciou alebo opakovanou ultrafiltráciou, prípadne dialyzou cez vhodnú membránu akou je napríklad celofánové potrubie, v prípade potreby sa zakoncentrováva na 20 až 50 gramov bielkovín na liter, pridáva sa také množstvo chloridu sodného, aby jeho koncentrácia v roztoku bola 3 až 9 gramov na liter, hodnota pH sa upraví na 6,4 až 7,4, v prípade potreby sa podrobí ďalšiemu spracovaniu napríklad pomocou gelovej, iontomennej alebo afinitnej chromatografie, pričom pred koncovou lyofilizáciou sa roztok stabilizuje pridaním glukózy, maltózy alebo iných cukrov, sterilizuje sa napríklad filtráciou, rozplňuje sa a lyofilizuje.

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

Príklad 1

Výhodziou surovinou môže byť bielkovinná pasta precipitátu imunoglobulinov IgG+IgA+IgM získaná pomocou kyseliny kaprylovej (Blatrix G., Israël J., Reinert Ph., Griscelli G., Steinbuch M.: La Nouvelle Presse Medicale 5,1193,1976).

Bielkovinný materiál nariedime destilovanou apyrogenou vodou o teplote 0 °C až +6 °C tak, aby koncentrácia bielkovín sa nachádzala v rozmedzí 5 až 100 gramov na liter, s optimom 20 až 40 gramov na liter. Hodnota pH takto vzniknutého roztoku býva zpravidla v rozmedzí 4,0 až 8,0. Takto pripravený roztok v optimálnej koncentrácii bielkovín má zpravidla zloženie v rozmedzí 9 až 12 g IgG, 5 až 8 g IgA, 1 až 2 g IgM. Všetky koncentrácie imunoglobulinov sú vzťahované na liter roztoku a boli stanovené pomocou Q antisér, výrobku fy. USOL Praha.

Rozdelenie roztoku obsahujúceho IgG+IgA+IgM na bielkovinnú pastu bohatú na IgG+IgM a na roztok bohatý na IgG+IgA sa prevádza pomocou precipitácie etanolom pri rozmedzí pH 4,0 až 8,0, s optimom 6,8 až 7,2, pri koncentrácii etanolu 6 až 10 obj. %; vzťahované na celkový objem reakčnej zmesi, pri konečnej teplote - 5 °C až - 12 °C pričom vyprecipitovaný sediment sa mieša alebo necháva stáť pri uvedených podmienkach 5 až 12 hodín.

Bielkovinný precipitát bohatý na IgG+IgM po následnej separácii, napríklad centrifugáciou, pri teplote - 5 °C až - 12 °C sa suspenduje vo vodnom roztoku chloridu sodného v apyrogennej vode o teplote 0 °C až + 6 °C o koncentrácii 3 až 9 g na liter na koncentraciu bielkovín 20 až 50 g na liter, upraví sa hodnota pH na 6,4 až 7,4 pričom sa získa bielkovinný roztok, kde na IgG v rozmedzí 9 - 12 g pripadá 1 - 2 g IgA a 2 - 3 g IgM. Všetky koncentrácie imunoglobulínov sú vzťahované na liter roztoku pričom boli stanovené pomocou testovacích súprav, ktoré vyrába fy. USOL Praha. V prípade potreby sa bielkovinný roztok podrobí ďalšiemu spracovaniu napríklad pomocou gelovej, iontomennej alebo afinitnej chromatografie, pred koncovou lyofilizáciou sa roztok stabilizuje napríklad pridaním glukózy, maltózy alebo iných cukrov, sterilizuje sa napríklad filtráciou, rozplňuje sa a lyofilizuje.

Supernatant je bielkovinný roztok bohatý na IgG+IgA kde na 5-6 g IgG pripadá 10 - 12,5 g IgA a 0,1 - 0,2 g IgM. Všetky koncentrácie imunoglobulínov sú vzťahované na liter roztoku pričom boli stanovené pomocou testovacích súprav, ktoré vyrába fy. USOL Praha. Supernatant bohatý na IgG+IgA sa zbavuje etanolu napríklad lyofilizáciou alebo opakovanou ultrafiltráciou alebo dialyzou cez vhodnú membranu, napríklad cez celofánové potrubie, v prípade potreby sa zakoncentrováva na koncentraciu bielkovín 20 až 50 g na liter, napríklad ultrafiltráciou alebo vymrazovaním, pridáva sa chlorid sodný do koncentrácie 3 až 9 g na liter, upraví sa pH na 6,4 až 7,4. V prípade potreby sa podrobí ďalšiemu spracovaniu napríklad pomocou gelovej, iontomennej alebo afinitnej chromatografie pred koncovou lyofilizáciou sa roztok stabilizuje napríklad pridávaním glukózy, maltózy alebo iných cukrov, sterilizuje sa napríklad filtráciou, rozplňuje sa a lyofilizuje.

Hodnoty koncentrácie jednotlivých imunoglobulínov v lyofilizovaných preparátoch IgG+IgM a IgG+IgA po rozpustení sú závislé od koncentrácie uvedených imunoglobulínov vo východnej plazme, sére alebo medzifrakcii ako aj od presnosti testovacej súpravy.

Príklad 2

Na prípravu imunoglobulinových preparátov na báze IgG+IgA+IgM použil Schwick a spol. síran amonný v kombinácii s rivanolom (Schwick H.G., Fischer J., Geiger H.: Progr.Immunobiol.Stand. 4,86,1970; Schwick H.G.: Vox Sang. 23,82,1972) a Pejaudier a spol. kyselinu boritú (Pejaudier L., Audran R., Steinbuch M.: Vox Sang. 23,165,1972). Východziou surovinou môže byť bielkovinná pasta IgG+IgA+IgM v purifikovanom stave izolovaná aj pomocou iných metod.

Východziou surovinou môže byť aj bielkovinný roztok IgG+IgA+IgM získaný napríklad podľa AO 247 303; AO 208 867 alebo pomocou gelovej, iontomennej alebo afinitnej chromatografie priamo z plazmy, séra alebo z medzifrakcie. Bielkovinná pasta sa uvedie do roztoku, a bielkovinný roztok sa spracováva v ďalšom postupe ako v príklade 1.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

1. Spôsob prípravy imunoglobulinových preparátov na báze IgG+IgA a IgG+IgM pre i.m. podanie z krvného zmesného imunoglobulinového preparátu na báze IgG+IgA+IgM, vyznačujúci sa tým, že tým, že bielkovinný roztok na báze IgG+IgA+IgM sa precipitáciou etanolom rozdelí na bielkovinný precipitát bohatý na IgG+IgM a na supernatant bohatý na IgG+IgA, čo sa prevádza tým spôsobom, že bielkovinný roztok IgG+IgA+IgM o koncentrácii 5 až 100 g na liter, s optimom 20 až 40 g na liter, pri rozmedzí pH 4,0 až 8,0, s optimom

6,8 až 7,2, sa precipituje etanolom a to 6 až 10 obj. % vzťahnuté na celkový objem reakčnej zmesi, pri konečnej teplote - 5 °C až - 12 °C pričom vyprecipitovaný sediment sa mieša alebo necháva stáť pri uvedených podmienkach 5 až 12 hodín. a potom sa pri-kročí ku oddeleniu sedimentu napríklad centrifugáciou pri teplote - 5 °C až - 12 °C.

2. Spôsob podľa bodu 1 vyznačujúci sa tým, že bielkovinný precipitát oddelený napríklad centrifugáciou predstavujúci frakciu bohatú na IgG+IgM sa suspenduje vo vodnom roztoku chloridu sodného v apyrogennej vode o teplote 0 °C až + 6 °C o koncentrácii 3 až 9 g na liter, na koncentráciu bielkovín 20 až 50 g na liter, upraví sa hodnota pH na 6,4 až 7,4, v prípade potreby sa podrobí ďalšiemu spracovaniu napríklad pomocou gelovej, iontomennej alebo afinitnej chromatografie, pred koncovou lyofilizáciou sa roztok stabilizuje pridaním glukózy, maltózy alebo iných cukrov, sterilizuje sa napríklad filtráciou, rozplňuje sa a lyofilizuje.
3. Spôsob podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že supernatant bohatý na IgG+IgA sa zbavuje etanolu napríklad lyofilizáciou alebo ultrafiltráciou prípadne dialýzou cez membránu, napríklad cez celofánové potrubie, upraví sa obsah bielkovín na 20 až 50 g na liter napríklad ultrafiltráciou alebo vymrazovaním, do roztoku sa pridáva chlorid sodný do koncentrácie 3 až 9 g na liter, upraví sa pH na 6,4 až 7,4, v prípade potreby sa podrobí ďalšiemu spracovaniu napríklad pomocou gelovej, iontomennej alebo afinitnej chromatografie, pred koncovou lyofilizáciou sa roztok stabilizuje pridaním glukózy, maltózy alebo iných cukrov, sterilizuje sa napríklad filtráciou, rozplňuje sa a lyofilizuje.
4. Spôsob podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že zpracovavateľným roztokom je roztok IgG+IgA+IgM, ktorý bol pripravený z normálnej alebo hyperimunnej plazmy prípadne z normálneho, retroplacentárneho alebo hyperimunného séra s definovanou antibakteriálnou, antitoxickou alebo antivirovou protilátkovou aktivitou.