



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

208867

(11)

B1

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 04 05 79
(21) PV 3058-79

(51) Int. Cl.³ A 61 K 39/395/
B 01 D 13/00

(40) Zveřejněno 30 01 81
(45) Vydáno 16 11 83

(75)

Autor vynálezu ŠTĚPÁNEK IVAN ing.CSc., ŠARIŠSKÉ MICHAĽANY
UHRÍK JULIUS prof.MUDr CSc., KOŠICE

(54)

Způsob odstraňování nízkomolekulárních sloučenin z roztoku krevních imunoglobulinů skupiny G,A,M

Způsob odstraňování nízkomolekulárních sloučenin z roztoku krevních imunoglobulinů skupiny G,A,M se týká diagnostické a terapeutické imunologie. Nízkomolekulární látky se dostávají do roztoku imunoglobulinů skupiny G,A,M v rámci technologického procesu, dále zásluhou mikrobiálního růstu a nastává koncentrační obohacení sloučenin s fyziologickobiochemickou aktivitou jako důsledek purifikace vzhledem k výchozímu materiálu. Jejich přítomnost vytváří předpoklady pro vznik nežádoucích interakcí s molekulami imunoglobulinů skupiny G,A,M, což omezuje kvalitu a rozsah indikace preparátu v praxi. Purifikované imunoglobuliny skupiny G,A,M se rozpouští v apyrogenní vodě na koncentraci bílkovin 1 až 15% s optimem 8±2% a separace nízkomolekulárních látek z roztoku imunoglobulinů skupiny G,A,M

se provádí průtokovou dialyzou proti 0,1 až 3,0 % roztoku Chloridu sodného v destilované apyrogenní vodě o teplotě 0 °C až +6 °C s hodnotou pH v rozmezí 4,0 až 7,0 při průtoku 300 ml až 2 000 ml za min.př. dobu 24 až 72 hodin při objemovém množství proteklého roztoku, které musí být minimálně 200 násobkem objemu bílkovinného roztoku, který byl umístěn do celofánového potrubí. Po ukončení dialyzy se provádí sterilizace imunoglobulinového roztoku skupiny G,A,M a jeho další zpracování.

Vynález se týká odstraňování nízkomolekulárních sloučenin z roztoku krevních imunoglobulinů skupiny G,A,M.

V posledním desetiletí se řada výrobců, kteří izolují z lidské nebo zvířecí krve preparáty s protilátkovou aktivitou, zaměřila na přípravu terapeutického preparátu gama globulinu, který obsahuje imunoglobuliny skupiny A nebo skupiny M, popřípadě směs imunoglobulinů A a M.

Na precipitaci balastních bílkovin ze směsi imunoglobulinů skupiny G,A,M byl použit síran amonný a rivanol/Schwich H.G., Fischer J., Geiger H.: Progr. Immunobiol. Stand. 4, 86, 1970; Schwich H.G.: Vox Sang. 23, 82, 1972/, kyselina bórátá/Pejaudier L., Audran R., Steinbuch M.: Vox Sang. 23, 165, 1972/ a kyselina kaprylová/Blatrix G., Israël J., Reinert Ph., Griscelli G., Steinbuch M.: La Nouvelle Presse Medicale 5, 1193, 1976/.

Současná technologická praxe však na jedné straně sice odděluje gama globulin s imunoglobuliny skupiny A a M od směsi jiných krevních bílkovin, ale na druhé straně zanáší do roztoku imunoglobulinů skupiny G,A,M nízkomolekulární anorganické nebo organické sloučeniny.

Technologický postup může taktéž část některých nízkomolekulárních sloučenin s biochemicko-fyziologickou aktivitou v roztoku imunoglobulinů G,A,M koncentrovat, t.j. obohacovat vzhledem k jejich koncentraci ve výchozí surovině, ze které byly imunoglobuliny skupiny G,A,M izolovány.

Přítomnost netěkavých anorganických solí, jakož i přítomnost nízkomolekulárních organických molekul v roztoku imunoglobulinů skupiny G,A,M vytváří předpoklady pro vznik nežádoucích interakcí těchto látek s molekulami imunoglobulinů skupiny G,A,M, a to zejména při lyofilizaci nebo při skladování v injekčním roztoku, což může snižovat kvalitu preparátu, popřípadě omezovat rozsah jeho aplikace v terapii.

Nedostatkem dosud užívané technologie je skutečnost, že takto připravené lyofilizované preparáty mají vysokou antikomplementární aktivitu, která byla zjištěna na základě úbytku aktivity komplementu po přidání rozpuštěného lyofilizovaného preparátu metodou podle Kabat-Mayera/Kabat E.A., Mayer M.M.: Experimentální imunochemie ČSAV, Praha 1965, str. 180/.

U nově navrhované technologie se tyto potíže nevyskytovaly v tak výrazné intenzitě, což lze dokumentovat údajem, že z 10 připravených experimentálních šarží podle předloženého

vynálezu, bylo dosaženo snížení antikomplementární aktivity u lyofilizovaného preparátu o 70% až 90% ve srovnání s tímtož materiálem, který byl lyofilizován bez předcházející separace nízkomolekulárních sloučenin.

Podstata odstraňování nízkomolekulárních anorganických nebo organických sloučenin spočívá podle předloženého vynálezu v tom, že bílkovinný materiál, obsahující imunoglobuliny skupiny G, A, M se suspenduje za aseptických podmínek v takovém množství apyrogenní destilované vody o teplotě 0 °C až +6 °C, aby hodnota koncentrace bílkovin se nacházela v rozmezí 1% až 15%, s optimem 8%±2%, roztok imunoglobulinů se vyčechá filtrací a separace nízkomolekulárních sloučenin se provádí z roztoku imunoglobulinů průtokovou dialyzou, například pomocí eluce s 0,1% až 3% roztokem chloridu sodného v destilované apyrogenní vodě, s optimem 0,45% až 0,9% chloridu sodného, o teplotě 0 °C až +6 °C s hodnotou pH v rozmezí 4,0 až 7,0 při průtoku 300 ml až 2 000 ml za minutu, po dobu 24 až 72 hodin.

Po ukončení dialyzy se z dialyzačního celofánového potrubí vytekly roztok imunoglobulinů skupiny G, A, M podrobní sterilní filtraci nebo radiační sterilizaci, rozplňuje se a v případě potřeby se lyofilizuje.

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

Příklad 1.

Výchozí surovinou je bílkovinná pasta precipitátu imunoglobulinů skupiny A, G, M, získaná způsobem podle Pejaudiera a spol./Pejaudier L., Audran R., Steinbuch M.: Vox Sang. 23, 165, 1972/. Bílkovinný materiál vyprecipitovaných imunoglobulinů se rozpouští v takovém množství destilované apyrogenní vody o teplotě 0 °C až +6 °C, aby hodnota koncentrace bílkovin se nacházela v rozmezí 1% až 15%, s optimem 8%±2%. Rozpouštění se urychluje mícháním. Po rozpouštění se roztok imunoglobulinů skupiny G, A, M vyčechá, například filtrací.

V technologických poměrech jsou výše uvedené podmínky zpravidla zachovány tehdy, když rozpouštíme 1 kg bílkovinné pasty imunoglobulinů skupiny G, A, M ve 2 000 ml destilované vody, testované na apyrogenitu, o teplotě 0 °C až +6 °C. Hodnota pH takto vzniklého imunoglobulinového roztoku skupiny G, A, M bývá zpravidla mezi 4,0 až 7,0 a koncentrace bílkovin v rozmezí 8%±2%. Takto připravený roztok se vyčechá například filtrací a nízkomolekulární sloučeniny se z roztoku odstraní dialyzou, například přes dialyzační celofánové potrubí/ pod komerčním označením "Dialysierschlauch", "Viscora" nebo na jiných celofánových materiálech/.

Namočené celofánové potrubí v apyrogenní vodě se naplní apyrogenní vodou za účelem stanovení celistvosti. Průměr celofánového potrubí by se měl pohybovat od 2 cm do 10 cm s optimem 5 cm. Spodní část celofánového potrubí se uzavře uzlem. Roztok imunoglobulinů skupiny G, A, M se nalije do celofánového potrubí, uzavřeného ve spodní části uzlem a uzavře se ve vrchní části uzlem se smyčkou, za kterou se zavěsí na vrchní víko dialyzační průtokové kolony.

Za optimální rozměry technologických dialyzačně průtokových kolon se považují takové, kde průměr kruhové, nebo uhlopříčka čtvercové nebo obdélníkové základní plochy k výšce kolony se pohybuje v poměru 1:5 až 1:10. Množství roztoku imunoglobulinů, naneseného do celofánového potrubí, umístěného v dialyzačně průtokové koloně nemá překročit 25% až 30%

objemu prázdné kolony.

Po nanesení zvoleného objemu imunoglobulinového roztoku se zahájí nucený průtok s 0,1% až 3,0% roztokem chloridu sodného v destilované apyrogenní vodě s optimem 0,45% až 0,9% o teplotě 0 °C až +6 °C, o pH 4,0 až 7,0, při průtoku 300 ml až 2 000 ml za minutu s výhodou při průtoku 1 000 ml/min. po dobu 48 hodin. Množství celkově proteklého roztoku chloridu sodného musí být minimálně 200 násobkem objemu bílkovinného roztoku, který byl umístěn do celofánového potrubí.

Po skončení dialysy se roztok imunoglobulinů skupiny G,A,M, umístěný v celofánovém potrubí, sejme ze závěsného háčku na vrchním víku dialyzačně průtokové kolony, opatrně se vyjme z kolony a po rozstřihnutí se imunoglobulinový roztok z dialyzačně celofánového potrubí podrobí sterilizaci, například filtrací nebo radiační sterilizaci a potom dalšímu zpracování, například lyofilizaci nebo zakoncentrování pomocí vakuové destilace, popřípadě pomocí membrán.

Numerické hodnoty, uváděné jako optima, jsou vhodné pro technologické provedení.

Příklad 2.

Výchozí surovinou může být bílkovinná pasta imunoglobulinů skupiny G,A,M, izolovaná i pomocí jiných metod. Bílkovinná pasta se zpracovává v dalším postupu jako v příkladě 1

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob odstraňování nízkomolekulárních sloučenin z roztoku krevních imunoglobulinů skupiny G,A,M, vyznačující se tím, že bílkovinný materiál, obsahující imunoglobuliny skupiny G,A,M se suspenduje za aseptických podmínek v takovém množství apyrogenní destilované vody o teplotě 0 °C až +6 °C, aby hodnota koncentrace bílkovin se nacházela v rozmezí 1 % až 15 %, roztok imunoglobulinů se vyčechá, například filtrací a separace nízkomolekulárních sloučenin se provádí z roztoku imunoglobulinů skupiny G,A,M průtokovou dialyzou proti 0,1% až 3,0% roztoku chloridu sodného v destilované vodě apyrogenní o teplotě 0 °C až +6 °C, s hodnotou pH v rozmezí 4,0 až 7,0, při průtoku 300 ml až 2 000 ml za minutu po dobu 24 až 72 hodin při objemovém množství celkově proteklého roztoku chloridu sodného, které musí být minimálně 200 násobkem objemu bílkovinného roztoku, který byl umístěn do celofánové fólie ve formě potrubí, při čemž oddialyzovaný roztok imunoglobulinů skupiny G,A,M se podrobí sterilizaci, například filtrací nebo radiační sterilizaci a potom dalšímu zpracování, například lyofilizaci nebo zakoncentrování pomocí vakuové destilace, popřípadě pomocí membrán.