



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

256654

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴

A 61 K 39/395

(22) Přihlášeno 23 08 85

(21) PV 6090-85

(40) Zveřejněno 17 09 87

(45) Vydáno 16 01 89

(75)

Autor vynálezu

POKORNÝ MILOŠ prom. chem. CSc., ULRYCH STANISLAV RNDr.,
BENEŠ MILAN ing. CSc., KYSELOVÁ MARTA PhMr., ODEHNALOVÁ NADEŽDA,
ŘENČOVÁ JIŘINA PhMr., PRAHA

(54) **Způsob přípravy specifického antitetanického imunoglobulinu z normální polyvalentní lidské plazmy nebo její vhodné mezifrakce**

Řešení se týká přípravy specifického protitetanického lidského imunoglobulinu z krevní plazmy, séra nebo vhodné frakce obsahující polyvalentní složení imunoglobulinů. Obohacení imunoglobulinu o specifické antitetanické protilátky je založeno na principu imunoadsorpce a desorpce. Imunosorbent je připraven imobilizací tetanického netoxického antigenu na pevný porézní nosič typu sférické celulózy nebo glykometakrylátu tuzemské výroby. Připravený imunosorbent se uvede do kontaktu s roztokem obsahujícím polyvalentní imunoglobulin za podmínek, při kterých dochází k imunosorpci. Po oddělení nezachyceného podílu bílkovin se provede desorpce kombinovaným účinkem koncentrovaného roztoku chloridu hořečnatého a dioxanu tak, aby nedošlo k nevratným změnám ve struktuře molekuly imunoglobulinu. Z takto získaného eluátu lze, po oddělení nadbytku solí a dioxanu, připravit lyofilisovaný imunoglobulin s několikanásobně zvýšeným obsahem tetanických protilátek, vhodný k přípravě injekční formy.

Vynález se týká přípravy specifického lidského antitetanického imunoglobulinu pomocí imunoadsorpce a eluce za užití tuzemských surovin a materiálů postupem, který umožňuje jeho získání v plně nativní formě vhodné pro přípravu injekčního roztoku se zvýšeným obsahem protitetanických protilátek.

Injekční roztoky lidských specifických imunoglobulinů, tj. roztoků se zvýšeným obsahem protilátek vůči vybraným bakteriálním či virovým antigenům, připravuje řada výrobců. V ČSSR jsou připravovány některé druhy v Ústavu sér a očkovacích látek pod firemním označením TEGA, RHEGA, HEPAGA. Zájem o tyto preparáty stále vzrůstá. Jejich příprava je však omezena počtem vybraných dárců plazmy, majících zvýšený obsah žádaných protilátek. Protitetanický lidský gamaglobulin (Gamma-globulinum antitetanicum humanum) připravuje v ČSSR Ústav sér a očkovacích látek etanolovou frakcionací lidské krevní plazmy od vybraných dárců. Finální injekční roztok obsahuje 10 % až 16 % bílkoviny, přičemž 2 ml ampule tohoto roztoku obsahuje nejméně 200 UI (mezinárodních jednotek) specifického protitetanického imunoglobulinu /Firemní materiály ÚSOL o. p. Praha/. Možnost přípravy specificky obohaceného imunoglobulinu z normální lidské plazmy na bázi imunoafinitní chromatografie prozatím naráželo na řadu problémů, spočívajících ve volbě vhodného pevného nosiče, antigenů a činidla, kterým by bylo možné uvolnit značně pevný komplex antigen-protilátka bez nevratných změn ve struktuře molekuly vázaného imunoglobulinu.

Do této doby se k desorpci při imunoafinitní chromatografii užívalo roztoků majících extrémní hodnoty pH od 1 do 3 nebo 10 do 12,5 či koncentrovaných roztoků močoviny nebo thiokyanatanu /M. Frenčík, B. Šárka: Biochemické laboratorní metody/, /C. R. Lowe, P. D. G. Dean: Afinitní chromatografie/, což vede k denaturaci bílkovin. Uvolnění vázaného imunoglobulinu pomocí koncentrovaných roztoků solí halogenidů s jednomocnými nebo dvoumocnými kovy je v daném případě pouze částečné /S. Avrameas, T. Tornøynk: Biochem. J. 102, 37b (1967)/.

Také roztoky samotných organických rozpouštědel, jako je etylenglykol a 1,4-dioxan, nedávají při eluci uspokojivé výsledky. Ani vlivem změny teploty při sorpci a desorpci není možné dosáhnout uspokojivých výsledků /K. K. Anderson a spol.: J. Immunol. Methods 25, 375 (1979)/. V našich podmínkách je též třeba věnovat pozornost výběru vhodného pevného nosiče, neboť zahraniční materiály jsou pro daný účel z ekonomického důvodu pro širší využití nedostupné.

Navržený způsob přípravy specifického lidského imunoglobulinu metodou imunoafinitní adsorpce a eluce řeší tyto nedostatky tím, že se na porézní sférickou celulózu nebo porézní glykometakrylátový nosič chemickou vazbou naváže tetanický anatoxin nebo směs anatoxinů, načež se takto připravený tetanický imunosorbent po promytí 0,05 M borátovým tlumivým roztokem pH 8 až 8,5, uvede vsádkově nebo protékáním sloupcem do kontaktu s roztokem obsahujícím normální polyvalentní imunoglobulin o pH 8,5 až 6,5 za chladu po dobu 6 až 48 hodin, poté se roztok nezašycených bílkovin oddělí, imunosorbent s navázaným specifickým imunoglobulinem se promyje 0,2 až 0,9% roztokem chloridu sodného a imunochemicky navázaný imunoglobulin se desorbuje při normální teplotě vodným 20% až 40% roztokem chloridu hořečnatého, který obsahuje 5% 1,4 dioxanu, případně 1% až 2% glukózy nebo maltózy jako stabilizátor, načež se takto získaný roztok specificky obohaceného imunoglobulinu zbaví nežádoucího množství solí a organického rozpouštědla dialýzou nebo diafiltrací a usuší lyofilizací.

Navržený postup přípravy imunoglobulinu, obohaceného o specifické protitetanické protilátky, využívá výhodných vlastností pevných nosičů perlové celulózy nebo glykometakrylátu, oba tuzemské výroby /M. Beneš a spol.: Čs. AO 229 010/, /H. Tláskalová: Immunochemistry 12, 801 (1975). Dále k imobilizaci je užito netoxického a neinfekčního antigenu vyráběného v ČSSR Ústavem sér a očkovacích látek k přípravě zvířecí očkovací látky. Předností tohoto anatoxinu je to, že obsahuje malé množství nežádoucích cizích balastních bílkovin.

Jako zdroj polyvalentního imunoglobulinu lze užít imunoglobulinovou frakci či mezifrakci

vznikající při frakcionaci lidské krevní plazmy metodou dle Cohna /E. J. Cohn a spol.: J. Amer. Chem. Soc. 72, 465 (1950). Výhodně lze užít imunoglobulin připravený z náhradních surovin.

Nezachycený podíl polyvalentního imunoglobulinu se dále zpracuje známým způsobem na sušený imunoglobulin a dále až na injekční roztok "Norga". Eluce imunochemicky navázaného imunoglobulinu je provedena kombinovaným roztokem chloridu hořečnatého, dioxanu a cukru za podmínek, při kterých nedochází k denaturaci a ztrátě aktivity uvolněného imunoglobulinu při dobrém výtěžku. Takto získaný specificky obohacený imunoglobulin je vhodný pro přípravu lékové formy. Navržený postup je technologicky snadno proveditelný a není náročný na zařízení. Imunosorbent lze opakovaně regenerovat. Z polyvalentního imunoglobulinu je možné podobně použitím různých imunosorbentů s vhodným navázaným antigenem připravit řadu příslušných specifických imunoglobulinů.

P ř í k l a d 1

K 10 ml vlhkého nosiče sférické substituované celulózy Ostsorb AV se přidá za chladu 20 ml 0,3 M kyseliny chlorovodíkové a 0,08 g dusitanu sodného. Suspense se za chladu míchá 30 minut. Potom se tekutina odfiltruje a diazotovaný nosič se promyje chladnou vodou. K aktivovanému nosiči se přidá 30 ml roztoku tetanického anatoxinu, který obsahuje okolo 0,2 % dílkovin, a u něhož bylo upraveno pH na 8,0 až 8,5.

Suspense se míchá po dobu 30 minut. Za těchto podmínek dochází k vazebné kopulaci s bílkovinnou složkou tetanického anatoxinu. Tekutina se odfiltruje, imunosorbent se promyje, desaktivují se zbývající volné funkční skupiny pomocí 0,2 M glycinového roztoku o pH 10 a promytí borátovým 0,05 M tlumivým roztokem pH 8,4, přidá se vsádkově 120 ml 8% roztoku polyvalentního imunoglobulinu připraveného etanolovou frakcionací. Suspense se za občasného promíchání ponechá ve styku při +4 °C po dobu 16 hodin, kdy dojde k imunochemické reakci imobilizovaný antigen-protilátka. Roztok nezachycených bílkovin se oddělí a imunosorbent se promyje 0,2% roztokem chloridu sodného. Roztok nezachycených bílkovin lze dále zpracovat dle potřeby známým způsobem na normální injekční roztok imunoglobulinů.

Z promytého imunosorbentu s navázaným specifickým imunoglobulinem se připraví chromatografický sloupec a provede se desorpce roztokem 40% chloridu hořečnatého, 5% dioxanu a 2% glukózy při normální teplotě. Získaný eluát obsahující specifický antitetanický imunoglobulin se zbaví soli a dioxanu dialyzou a usuší se lyofilizací. Ze sušeného imunoglobulinu se zvýšeným obsahem protitetanických protilátek se připraví injekční roztok tak, aby 2 ml tohoto roztoku obsahovalo nejméně 200 UI.

P ř í k l a d 2

K 10 g vlhkého, to je 3,5 g suchého, glykolmetakrylátového nosiče Separon R Hema 1 000 E se přidá 15 ml tetanického anatoxinu zředěného 25 ml 0,05 M borátového tlumivého roztoku pH 8,3 a pH roztoku se upraví na hodnotu 8,0. K suspensi se přidá 10,5 g síranu amonného. Po rozpuštění soli se suspense ponechá za občasného promíchání ve styku za chladu 24 hodin. Potom se oddělí tekutina dekantací, imunosorbent se promyje, volné funkční skupiny se desaktivují přidáním 20 ml 0,1 M kyseliny chloristé a imunosorbent se promyje 0,05 M borátovým tlumivým roztokem pH 8,3.

Z promytého imunosorbentu se připraví chromatografický sloupec, přes který se ponechá pozvolna, případně opakovaně, protékat 5% roztok bílkovin, obsahující převážně imunoglobulinovou frakci, v celkovém množství 150 ml. Během této operace dochází k imunochemické reakci mezi imobilizovaným antigenem a protilátkou. Roztok nezachycených bílkovin se potom dále zpracuje dle potřeby známým způsobem. Sloupec imunosorbentu s navázaným specifickým imunoglobulinem se promyje 0,9% roztokem chloridu sodného a desorpce se provede roztokem 20% chloridu hořečnatého, 5% dioxanu a 2% maltózy při normální teplotě. Získaný eluát se zpracuje dále postupem uvedeným v příkladě 1.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob přípravy lidského specifického imunoglobulinu z normální, polyvalentní lidské plazmy nebo její vhodné frakce obsahující imunoglobuliny, pomocí imunoadsorpce a eluce, vyznačující se tím, že se na porézní sférickou celulózu nebo porézní glykometakrylátový nosič chemickou vazbou naváže tetanický anatoxin nebo směs anatoxinů, načež se takto připravený tetanický imunosorbent po promytí 0,5 M borátovým tlumivým roztokem pH 8,0 až 8,5, uvede vsádkově nebo protékáním sloupcem do kontaktu s roztokem obsahujícím normální polyvalentní imunoglobulin při pH 6,0 až 8,5 při teplotě 1 až 8 °C po dobu 6 až 48 hodin, poté se roztok nezachycených bílkovin oddělí, imunosorbent s navázeným specifickým imunoglobulinem se promyje 0,2 až 0,9% roztokem chloridu sodného a imunochemicky navázaný imunoglobulin se desorbuje vodným 20% až 40% roztokem chloridu hořečnatého, který dále obsahuje 5% 1,4-dioxanu, případně 1% až 2% glukózy nebo maltózy jako stabilizátor, načež se roztok specificky obohaceného imunoglobulinu zbaví nežádoucího množství solí a organického rozpouštědla dialýzou nebo diafiltrací a usuší lyofilizací.