



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

208868

(11)

B1

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 04 05 79
(21) PV 3059-79

(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 krevního gamaglobulinu

Způsob odstraňování nízkomolekulárních sloučenin z roztoku krevního gamaglobulinu se týká diagnostické a terapeutické imunologie. Nízkomolekulární látky se dostávají do roztoku gamaglobulinu v rámci technologického procesu, dále zástuhou 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 gamaglobulinu, což omezuje kvalitu a rozsah indikace preparátu v terapii. Purifikovaný gamaglobulin se rozpouští v apyrogenní vodě na koncentraci bílkovin v rozmezí 2 až 15% s optimem 8±2% a separace nízkomolekulárních látek z gamaglobulinového roztoku se provádí průtokovou dialyzou proti 0,1 až 3% roztoku

chloridu sodného v destilované apyrogenní vodě o teplotě 0 °C až +6 °C a hodnotou pH v rozmezí 4,0 až 7,0 při průtoku 300 ml až 2 000 ml za minutu po dobů 24 až 72 hodin při objemovém množství protékajícího roztoku, které musí být minimálně 200 násobkem objemu bílkovinného roztoku, který byl umístěn do celofánového potrubí. Po skončení dialýzy se provádí sterilizace gamaglobulinového roztoku a jeho další zpracování.

Vynález se týká způsobu odstraňování nízkomolekulárních sloučenin z roztoku krevního gama globulinu. V posledním desetiletí se řada výrobců, kteří izolují z lidské nebo zvířecí krve gama globulin, zaměřila na co nejefektivnější využití gama globulinu. Až dosud se při výrobě gama globulinu kladl důraz na jeho výtěžnost a na elektroforetickou čistotu.

Na precipitaci gama globulinu ze směsi plasmatických nebo sérových krevních bílkovin byl použit siran amonný a hydroxyd hlinitý /Schultze H.E., Matheka H.D.: Behringwerke Mitt. 28, 9, 1954; Schultze H.E., Schönenberger M., Matheka H.D.: Behringwerke Mitt. 26, 21, 1952/, rivanol /Hořejší J., Smetana R.: Acta Med. Scandinavica 155, 65, 1956/, siran sodný /Amirajan K., Leikhim E.J.: J. Immunol. 87, 301, 1961/, chlorid hlinitý /Lewin J. Therapie 9, 523, 1954/, DEAE celulóza /Sober H.A., Peterson E.A.: Fed. Proc. 17, 1116, 1958; Peterson E.A., Sober H.A.: J. Am. Chem. Soc. 78, 756, 1956; Fahey J.L., Herbett A.P.: J. Biol. Chem. 234, 2645, 1959; Stanworth D.H.: Nature 188, 156, 1960/, kyselina kaprylová /Steinbuch M., Audran R.: Rev. Franc. d'etud. Clin. Biol. 14, 1054, 1969/ ionty Zn^{++} a Al^{+++} /Rejnek J., Škvařil F.: Coll. Czechoslov. Commun. 22, 1489, 1957; Rejnek J., Škvařil F.: Coll. Czechoslov. Chem. Commun. 23, 773, 1958; Krauze R., Naimski K., Zakrewski K.: Acta Biochim. Pol. 8, 209, 1961/, polymetaphosfát /Nitschman H.S., Rickli R., Kistler P.: Vox Sang. 5, 232, 1960/, etér /Pennel R.B., Putnam F.W.: ed. The Plasma Proteins vol. I Academic Press-New York 1960, str. 9/ a etanol /Cohn E.J., Gurd F.N.R., Surgenor D.M., Barnes B.A., Brown R.K., Derouaux G., Gillespie J.M., Kahnt F.W., Lever W.F., Liu C.H., Mittelman D., Mouton R.F., Schmid K., Uroma E.: J. Am. Chem. Soc. 72, 465, 1950; Deutsch H.F., Gostling G.L., Alberty R.A., Williams J.W.: J. Biol. Chem. 164, 109, 1946; Oncley J.L., Melin M., Rickert D.A., Cameron J.W., Gross P.M.: J. Am. Chem. Soc. 71, 541, 1949; Nitschman H.S., Kistler P., Lergier W.: Helv. Chim. Acta 37, 866, 1954; Kistler, Nitschman H.S.: Vox Sang. 7, 414, 1962; Taylor H.L., Bloom F.C., Mc Call K.B., Hyndman L.A., Anderson H.D.: J. Am. Chem. Soc. 78, 1356, 1956/.

Současná technologická praxe však na jedné straně sice odděluje gama globulin od směsi jiných krevních bílkovin, ale na druhé straně zanáší do gama globulinového roztoku nízkomolekulární anorganické nebo organické sloučeniny. Technologický postup může také část některých nízkomolekulárních sloučenin s biochemicko-fysiologickou aktivitou v roztoku gama globulinu koncentrovat, tj. obohacovat vzhledem k jejich koncentraci ve výchozí surovině, ze které byl gama globulin izolován.

Přítomnost netěkavých anorganických solí v roztoku gama globulinu, jako i přítomnost

netěkavých nízkomolekulárních organických molekul v roztoku gama globulinu vytváří předpoklady pro vznik nežádoucích interakcí těchto látek s molekulami gama globulinu a to zejména při lyofilizaci nebo při skladování v injekčním roztoku, což může snižovat kvalitu preparátu a popřípadě omezovat rozsah jeho indikace 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 Kbat-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 intensitě, 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 z roztoku gama globulinu spočívá podle předloženého vynálezu v tom, že bílkovinný materiál, obsahující purifikovaný gama globulin se suspenduje za aseptických podmínek v takovém množství apyrogenní destilované vody o teplotě 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$, aby hodnota koncentrace bílkovin se nacházela v rozmezí 2% až 15%, s optimem $8\% \pm 2\%$, gama globulinový roztok se vyčechá například filtrací a separace nízkomolekulárních sloučenin z gama globulinového roztoku se provádí průtokovou dialyzou proti 0,1% až 3,0% roztoku chloridu sodného v destilované apyrogenní vodě, s optimem 0,45% až 0,9% chloridu sodného, o teplotě 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$ s hodnotou pH v rozmezí 4,0 až 7,0 při průtoku 300 až 2 000 ml za minutu po dobu 24 až 72 hodin. Množství celkově proteklého roztoku chloridu sodného musí být minimálně 200 násobkem objemu bílkovinného roztoku, který byl umístěn do celofánového potrubí.

Po ukončení dialyzy se gama globulinový roztok podrobí sterilizaci například filtrací nebo radiační sterilizací a potom dalšímu zpracování například lyofilizací nebo zakonzentrování pomocí vakuové destilace popřípadě pomocí membrán.

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

PŘÍKLADY PROVEDENÍ

Příklad 1.

Výchozí surovinou je pasta frakce II, izolovaná metodou podle Cohna. Bílkovinný gama globulinový materiál se rozpouští v takovém množství destilované apyrogenní vody o teplotě 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$, aby hodnota koncentrace bílkovin se nacházela v rozmezí 2% až 15%, s optimem $8\% \pm 2\%$. Rozpuštění se urychluje mícháním. Po rozpuštění se gama globulinový roztok vyčechá, například filtrací.

V technologických poměrech jsou výše uvedené podmínky zpravidla zachovány tehdy, když rozpouštíme 1 kg gama globulinové pasty ve 2 000 ml destilované apyrogenní vody o teplotě 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$. Hodnota pH takto vzniklého gama globulinového roztoku bývá zpravidla mezi pH 4,0 až 7,0 a koncentrace bílkovin v rozmezí $8\% \pm 2\%$. Takto připravený

roztok purifikovaného gama globulinu se vyčepí například filtrací a nízkomolekulární sloučeniny se z gama globulinového roztoku odstraní dialyzou, například přes dialyzační celofánové potrubí/pod komerčním označením "Dialysierschlauch" anebo "Viskora" nebo na jiných celofánových materiálech z celofánu.

Namočené celofánové potrubí v apyrogenní vodě se naplní apyrogenní vodou o teplotě 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$ 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. Gama globulinový roztok se nalije do celofánového potrubí, uzavřeného ve spodní části uzlem, a uzavře se ve vrchní části uzlem se smyčkou, za kterou se zavěsí na háček ve vrchním víku dialyzační průtokové kolony. Za optimální rozměry technologické dialyzační průtokové kolony se považují takové, kde průměr kruhové nebo uhlopříčka čtvercové nebo obdélníkové základní plochy k výšce kolony se pohybují v poměru 1:5 až 1:10. Množství gama globulinového roztoku, naneseného na dialyzační průtokovou kolonu nemá překročit 25% až 30% objemu prázdné kolony.

Po nanesení zvoleného objemu do vnitřku celofánového potrubí se gama globulinový roztok, umístěný v potrubí, zavěsí na vrchní víko a zahájí se průtok 0,1% až 3,0% roztoku chloridu sodného v destilované apyrogenní vodě, s optimem 0,45% až 0,9%, o teplotě 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$ a hodnotě pH mezi 4,0 až 7,0 v množství 300 ml až 2 000 ml za minutu po dobu 24 až 72 hodin, s výhodou při průtoku 1 000 ml/min. po dobu 48 hodin. Celkové množství protektého roztoku chloridu sodného musí být minimálně 200 násobkem objemu bílkovinného roztoku, který byl umístěn do celofánového potrubí.

Gama globulinový roztok se po skončení dialyzy sejme ze závěsného háčku na víku dialyzační průtokové kolony, opatrně se vyjme z kolony a po rozstřihnutí celofánového potrubí se gama globulinový roztok přeleje do sběrné nádoby. Potom se gama globulinový roztok podrobí sterilizaci, například filtrací nebo radiační sterilizací a dalšímu zpracování, například lyofilizaci nebo zakoncentrování pomocí vakuové destilace, popřípadě pomocí membrán.

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

Příklad 2.

Výchzí surovinou může být bílkovinná pasta gama globulinu, izolovaná i pomocí jiných metod, jejichž seznam je uveden v literárním přehledu. Bílkovinná pasta se zpracovává v dalším postupu jako v příkladě 1.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob odstraňování nízkomolekulárních sloučenin z roztoku krevního gama globulinu, vyznačující se tím, že bílkovinný materiál, obsahující purifikovaný gama globulin se suspenduje za aseptických podmínek v takovém množství apyrogenní destilované vody o teplotě 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$, aby hodnota koncentrace bílkovin se nacházela v rozmezí 2% až 15%, gama globulinový roztok se vyčechá například filtrací a separace nízkomolekulárních sloučenin z gama globulinového roztoku se provádí průtokovou dialyzou proti 0,1% až 3,0% roztoku chloridu sodného v destilované apyrogenní vodě o teplotě 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$ 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 gama globulinový roztok se podrobí sterilizaci, například filtrací nebo radiační sterilizací a potom dalšímu zpracování, například lyofilizaci nebo zakoncentrování pomocí vakuové destilace, popřípadě pomocí membrán.