



ÚRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

244306

(11)

(B1)

{22} Prihlásené 27 12 82

{21} [PV 9674-82]

{40} Zverejnené 17 09 84

{45} Vydané 15 11 87

{51} Int. Cl.⁴
A 61 K 39/395

{75}

Autor vynálezu

ŠTĚPÁNEK IVAN ing. CSc., ŠARIŠSKÉ MICHALANY

{54} Spôsob prípravy krvného gama globulínu so zníženým hypotenzívnym a antikomplementárnym účinkom

1

Vynález sa týka spôsobu prípravy krvného gama globulínu, z normálnej alebo hyperimúnnnej plazmy, prípadne z normálneho alebo retroplacentárneho, prípadne hyperimúnnneho séra, ktorý je určený pre terapeutické účely.

Až doposiaľ sa realizuje príprava gama globulínu pre terapeutické účely prevažne podľa kritérií pre intramuskulárne podanie, t. j. kladie sa dôraz na výťažnosť, elektroforetickú čistotu a na obsah látok so schopnosťou vyvolať pyretickú reakciu.

Na precipitáciu gama globulínu zo zmesi plazmatických alebo sérových bielkovín bol použitý síran amónny a hydroxid 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. Scand. 155, 65, 1956), síran sodný (Amiraian 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, 1 116, 1958; Peterson E. A., Sober H. A.: J. Am. Chem. Soc. 78, 756, 1956; Fahey J. L., Herbert A. P.: J. Biol. Chem. 234, 2 645, 1959; Stanworth D. H.: Nature 188, 156, 1960), kyselina kaprylová (Steinbuch M., Audran R.: Rev. Franc. D'étud. Clin. Biol., 14, 1 054,

2

1969), ionty Zn^{++} a Al^{+++} (Rejnek J., Škvařil F.: Coll. Czechoslov. Chem. Commun. 22, 1 489, 1957); Rejnek J., Škvařil F.: Coll. Czechoslov. Chem. Commun. 23, 773, 1958; Krauze R., Naimski K., Zakrewski K.: Acta Biochim. Pol. 8, 209, 1961), polymetafosfát (Nitschman H. S., Rickli R., Kistler P.: Vox Sang. 5, 232, 1960), éter (Pennell R. B. v 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 P., Nitschman H. S.: Vox Sang. 7, 414, 1962; Taylor H. L. Bloom F. C., McCall K. B., Hyndman L. A., Anderson H. D.: J. Am. Chem. Soc. 78, 1 356, 1956).

Preparáty gama globulínu pripravené podľa doposiaľ platných kritérií pre intramuskulárne podanie majú zpravidla dokazateľný obsah histamínu, ďalej hypotenzívny a antikomplementárny účinok, čo je pre kva-

litu intravenózných preparátov neprípustne. Podanie intramuskulárneho preparátu týchto kvalít intravenózne môže v dôsledku náhleho poklesu krvného tlaku pacienta ohroziť a v dôsledku antikomplementárnej aktivity oslabiť jeho nešpecifickú imúnologickú obranu.

Napriek tomu, že hypotenzívny účinok pri intramuskulárnom podaní nemá taký priebeh ako pri intravenóznom podaní možno ho označiť spolu s vysokým antikomplementárnym účinkom a dokazateľným obsahom histamínu za vlastnosti nežiadúce pre preparáty gama globulínu, ktoré sú určené pre terapeutické účely či už pre intramuskulárne alebo intravenózne podanie.

Na odstraňovanie antikomplementárnej aktivity gama globulínu, ktorý bol pripravený zo zmesi plazmatických alebo sérových krvných bielkovín bola použitá úprava hodnoty pH na 4,0 pri 24hodinovej inkubácii pri 37 °C (Barandun S., Kistler P., Jeunet F., Isliker H.: Vox Sang. 7, 157, 1962).

Pokles antikomplementárnej aktivity gama globulínu bol zaznamenaný po pridaní aktívneho uhlia (Steinbuch M., Audran R., Amouch P., Blatrix C.: Vox Sang. 13, 103, 1967), po pridaní tricalciumfosfátu (Steinbuch M., Audran R., Amouch P., Blatrix C.: Rev. med. Tours, suppl. No. 3, 79, 1968) a po pridaní albumínu (Auerswald W., Kiese-wetter E.: Wien. med. Wschr. 115, 690, 1965).

Znižovanie antikomplementárnej aktivity gama globulínového roztoku pomocou proteolytického štiepenia bolo realizované pepsínom (Schultze H. E., Schwick G.: Dtsch. med. Wschr. 87, 1643, 1962) a plazmínom (Sgouris J. T.: Vox. Sang. 13, 71, 1967; Barandun S., Castel F., Makula M. F., Morell A., Plan R., Škvařil F.: Vox Sang. 28, 157, 1975).

Antikomplementárnú aktivitu gama globulinovej molekuly je možné znížiť jej chemickou redukciou beta merkaptóetanolom (Wiedermann G., Miescher P. A., Franklin E. C.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 113, 609, 1963), modifikáciou beta propiolaktonom (Stephan W.: Z. klin. Chem. 7, 282, 1969; Stephan W.: Vox Sang. 28, 422, 1975), redukciou s dithioerythritolom (Isenman D. E., Dorrington K. J., Painter R. H.: J. Immun. 114, 1726, 1975), sulfonáciou (Masuho Y., Tomibe K., Matsuzawa K., Ohtsu A.: Vox Sang. 32, 175, 1977), amidáciou (Schmidtberger R.: US Patent No 4 118 379 /1978/), redukciou s dithiothreitolom a alkyláciou s jodacetamidom (Fernandes P. M., Lundblad J. L.: Vox Sang. 39, 101, 1980) a redukciou s dithiothreitolom v kombinácii s dithioerythritolom s následnou alkyláciou pomocou jodacetamidu alebo metyljodidu, akrylonitrilu, benzylbromidu, prípadne etylénoxidu (Schroeder D. D., Tankersley D. L., Lundblad J. L.: Vox Sang. 40, 373, 1981).

Antikomplementárna aktivita gama globulínu súvisí jednak so vznikom polymérov gama globulínu, ktoré môžu vznikať v pro-

cese technologickej izolácie a jednak vzniká v procese lyofilizácie v dôsledku interakcie nízkomolekulárnych látok s molekulami gama globulínu. Použitie destilovanej apyrogénnej vody pri separácii nízkomolekulárnych látok z gama globulínu jednak spôsobuje precipitáciu najmä vyšších polymérov gama globulínu a jednak odstránenie nízkomolekulárnych látok, v dôsledku čoho pri lyofilizácii nemôže dôjsť ku ich interakcii s molekulami gama globulínu, čiže nedochádza ku vzniku antikomplementárnej aktivity. Použitie vodného roztoku chloridu sodného, v koncentrácii do 30 g na liter, zaručuje polymérom gama globulínu v roztoku potrebnú stabilitu a dochádza len ku separácii nízkomolekulárnych látok, ktoré spôsobujú vznik antikomplementárnej aktivity v procese izolácie.

Antikomplementárna aktivita bola testovaná na základe úbytku aktivity komplementu. Úbytok známej hodnoty aktivity komplementu po pridaní známeho množstva roztoku lyofilizovaného gama globulínového preparátu bol stanovený metódou podľa Kabáta a Mayera (Kabát E. A., Mayer M. M.: Experimentální imunochémie ČSAV, Praha, 1965, str. 180).

Efekt destilovanej apyrogénnej vody pri odstraňovaní antikomplementárnej aktivity je možné dokumentovať u 10 experimentálnych šarží gama globulínu, ktorý bol izolovaný pomocou extrakcie z frakcie III podľa Cohna a Oncleya. Pokiaľ bola použitá samotná destilovaná apyrogénna voda bolo dosiahnuté zníženie antikomplementárnej aktivity gama globulínu po lyofilizácii o 80 až 95 %. Použitie vodného roztoku chloridu sodného, za použitia toho istého gama globulínového materiálu, v koncentrácii do 30 gramov na liter spôsobilo zníženie antikomplementárnej aktivity gama globulínu po lyofilizácii iba o 35 až 45 %. Pokiaľ niesu v roztoku gama globulínu prítomné jeho vyššie polyméry sú výsledky testovania antikomplementárnej aktivity v lyofilizovanom gama globulínovom preparáte, z ktorého boli odstránené nízkomolekulárne látky za použitia destilovanej apyrogénnej vody alebo za použitia vodného roztoku chloridu sodného do 30 g na liter prakticky rovnaké.

Hypotenzívny účinok bol testovaný na základe poklesu krvného tlaku kráľíka priamou krvnou metódou podľa ČSL 3 (ČSL 3, sväzok I., vydanie III., Avicenum Praha 1970, str. 149) s tým, že králikovi o váhe 2 až 3 kg sa aplikujú 2 ml gama globulínového roztoku na kg hmotnosti. Obsah gama globulínu v aplikovanom roztoku je 50 g na 1 000 ml roztoku. U preparátov pripravených podľa navrhovaného postupu sa hypotenzívna aktivita nevyskytovala v tak výraznej intenzite, čo je možné dokumentovať údajom, že z 10 pripravených experimentálnych šarží podľa predloženého vynálezu bol stanovený pokles systolického krvného tlaku maximál-

ne o 4 až 8 % v porovnaní s tým istým materiálom v tej istej dávke bez separácie nízkomolekulárnych zlúčenín, kde bol stanovený pokles systolického krvného tlaku od 20 do 30 %.

Obsah histamínu bol testovaný Gadumovou modifikáciou (Gadum J. H.: J. Physiol 8, 467, 1949) Magnusonovej metódy (Magnus R.: Plüg. Arch. 102, 123, 1904). U preparátov pripravených podľa navrhovaného postupu sa kotraktácie morčacieho čreva nevyskytovali, čo je možné dokumentovať údajom, že z 10 experimentálnych šarží pripravených podľa predloženého vynálezu bolo nájdené 0,0 mikrogramu histamínu na 100 gramu gama globulínu v porovnaní s tým istým materiálom, ktorý bol lyofilizovaný bez predchádzajúcej separácie nízkomolekulárnych látok, kde bol stanovený obsah histamínu v koncentrácii 20 až 40 mikrogramov na 100 gramov lyofilizovaného gama globulínu.

Súčasná technologická prax na jednej strane sice oddeľuje gama globulín od zmesi iných krvných bielkovín a jednak pri separácii a taktiež pri znižovaní antikomplementárnej aktivity zanáša do roztoku gama globulínu nízkomolekulárne látky anorganického alebo organického charakteru. Princíp odstraňovania nízkomolekulárnych látok s využitím dialýzy, oproti 0,1 až 0,3 %-nému vodnému roztoku chloridu sodného bol použitý u gama globulínu (Štěpánek I.: AO č. 202 180; Štěpánek I., Uhrík J.: AO 208 868; Štěpánek I., Stachy A., Barla I., Banda I.: AO 204 168), ako aj u zmesného imunoglobulinového preparátu na báze IgG + IgA + IgM (Štěpánek I., Uhrík J.: AO 208 867).

Podstatou vynálezu je odstránenie balastných negamaglobulínových prímiesí, ktoré majú, vzhľadom ku gama globulínu nižšiu molekulárnu hmotnosť. Za hraničné hodnoty možno považovať údaje okolo 50 000 molekulárnej hmotnosti.

Východziu surovinou môže byť pasta frakcie II, izolovaná metódou podľa Cohna a Oncleya z normálnej alebo hyperimúnnej plazmy, prípadne z normálneho alebo retroplacentárneho, prípadne hyperimúnneho séra. Taktiež však môžu byť použité bielkovinné gama globulínové materiály izolované pomocou iných metód.

Bielkovinný materiál sa rozpúšťa v takom množstve destilovanej apyrogénnej vody o teplote 0 °C až +6 °C, aby sa hodnota koncentrácie bielkovín nachádzala v rozmedzí 10 až 180 gramov na liter, s optimom 60 až 100 gramov na liter. Rozpúšťanie sa urýchljuje miešaním. Po rozpustení sa gama globulínový roztok vyčirí, napríklad filtráciou.

V technologických pomeroch sú vyššie uvedené optimálne podmienky zpravidla zachované vtedy ak rozpúšťame 1 kg gama globulínovej pasty v 2 000 ml destilovanej apyrogénnej vody o teplote 0 °C až +6 °C. Hodnota pH takto pripraveného gama globulínového roztoku býva spravidla v rozme-

dzí 4,0 až 8,0 a koncentrácia bielkovín v rozmedzí 60 až 100 gramov na liter. Takto pripravený roztok gama globulínu sa vyčirí, napríklad filtráciou, a nízkomolekulárne zlúčeniny do molekulárnej hmotnosti 50 000 sa oddelia spôsobom podľa vynálezu ultrafiltráciou, diafiltráciou, gélovou filtráciou a dialýzou, oproti destilovanej apyrogénnej vode pri teplote 0 °C až +6 °C, pri pH 4,0 až 8,0. Ďalej sa gama globulínový roztok po oddelení nízkomolekulových zlúčenín sterilizuje, napríklad filtráciou alebo pomocou iných metód, a potom sa zakoncentrováva, napríklad lyofilizáciou alebo pomocou membrán, vákuovou destiláciou, vymrazovaním alebo inými metódami a v prípade potreby sa podrobí ďalšiemu spracovaniu.

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

Príklady prevedenia

Príklad 1

Východzou surovinou môže byť pasta frakcie II izolovaná metódou podľa Cohna a Oncleya z normálnej alebo hyperimúnnej plazmy, prípadne z normálneho alebo retroplacentárneho, prípadne hyperimúnneho séra s antibakteriálnou, antitoxickou alebo antivírusovou protilátkovou aktivitou. Bielkovinný gama globulínový materiál sa rozpúšťa v takom množstve destilovanej apyrogénnej vody o teplote 0 °C až +6 °C, aby hodnota koncentrácie bielkovín sa nachádzala v rozmedzí 10 až 180 gramov na liter, s optimom 60 až 100 gramov na liter. Rozpúšťanie sa urýchljuje miešaním. Po rozpustení sa gama globulínový roztok vyčirí, napríklad filtráciou.

V technologických pomeroch sú vyššie uvedené podmienky optima spravidla zachované vtedy, ak rozpúšťame 1 kg gama globulínovej pasty v 2 000 ml destilovanej apyrogénnej vody o teplote 0 °C až +6 °C. Hodnota pH gama globulínového roztoku býva spravidla v rozmedzí 4,0 až 8,0 a koncentrácia bielkovín v rozmedzí 60 až 100 gramov na liter. Takto pripravený roztok purifikovaného gama globulínu sa vyčirí, napríklad filtráciou a nízkomolekulárne zlúčeniny sa z gama globulínového roztoku odstraňujú:

- A. Gélovou filtráciou
- B. Dialýzou
- C. Ultrafiltráciou
- D. Diafiltráciou

A.

V súčasnosti existuje celá rada komerčných materiálov pre gélovú filtráciu na báze dextranových gélov, pod označením Sephadex, polyakrylamidových gélov, pod o-

značením Biogel, hydroxyalkylmetakrylátových gélov, pod označením Spheron, polystyrenových gélov, pod označením Styragel, polyvinylacetátových gélov pod označením Merckogel, poróznych silikátov, pod označením Porasil, a poréznych skiel pod označením Bioglas, ktoré majú odstupňované veľkosti pórov v gélových časticiach a umožňujú gélovú filtráciu v pomerne širokých rozmedziach molekulárnych hmotností.

Odstránenie nízkomolekulárnych zlúčenín sa prevádza elučnou gélovou chromatografiou s destilovanou apyrogénnou vodou pri teplote 0 °C až +6 °C, pri pH 4,0 až 8,0 s vyľučovacou medzou gélu vyjadrenou molekulárnou hmotnosťou do 50 000, pričom je potrebné uvedené materiály používať v optimálnom zrnení zaručujúcim prietok v technologických podmienkach.

Do kolóny naplnenej s napučaným gélovým materiálom nechávame nasávať gama globulínový roztok takou rýchlosťou, aby prietok spodnou plochou kolóny sa pohyboval medzi 0,01 ml až 3,0 ml za minútu na plochu 1 cm². Množstvo gama globulínového roztoku nasadeného na kolónu nemá prekročiť 25 až 30 % objemu gélovej časti kolóny. Účinnosť delenia je možné sledovať podľa stupňa oddelenia etylalkoholu, chloroformu a ninhydrín pozitívnych látok z gama globulínového roztoku. Pokiaľ by nedošlo ku dokonalému oddeleniu je potrebné zmenšiť obsah vkladného gama globulínového roztoku na kolónu a spomaliť prietok. Po separácii nízkomolekulárnych zlúčenín z gama globulínového roztoku sa tento ďalej spracováva.

B.

Dialýza sa v poslednom desaťročí znovu začína uplatňovať najmä pri výrobe liečiv ako technologická metóda separácie tých zmesí prírodných alebo syntetických látok, ktorých molekuly majú podstatne rozdielnú hmotnosť.

V súčasnosti existuje celá rada komerčných membrán pre dialýzu či už v podobe rovínnej membrány, alebo v podobe potrubia o menšom priemere a menšom veľkosti pórov na báze regenerovanej celulózy alebo jej derivátov, prípadne na báze kolódia a taktiež aj na báze vinylových polymérov.

Sterilný roztok purifikovaného gama globulínu sa opatrne presaje do sterilného dialyzačného potrubia, ktoré sa pred zahájením presávania v spodnej časti uzatvorí uzlom a po presatí sa vrchná časť utvorí uzlom so smyčkou, za ktorú sa naplnené potrubie zavesí na háčik, ktorý je tak umiestnený, aby roztok gama globulínu v dialyzačnom potrubí bol v styku s pretekajúcou destilovanou apyrogénnou vodou pri teplote 0 °C až +6 °C pri pH 4,0 až 8,0, pričom veľkosť pórov v dialyzačnej membráne by mala byť tak veľká, aby umožnila separá-

ciu nízkomolekulárnych zlúčenín vyjadrenú molekulárnou hmotnosťou do 50 000.

Koniec dialýzy je indikovaný negatívnou reakciou na etanol, chlórform a na ninhydrín pozitívne látky v pretekajúcej dialyzačnej tekutine ako aj negatívnou reakciou na etanol a chloroform v gama globulínovom roztoku. Po skončení dialýzy sa dialyzačné potrubie s gama globulínovým roztokom zvesí z háčika, opatrne sa vyberie a po rozstrihnutí sa gama globulínový roztok preleje do zbernej nádoby a ďalej sa spracováva.

C.

Separácia relatívne nízkomolekulárnych zlúčenín do molekulovej hmotnosti do 50 000 sa môže uskutočniť aj pomocou ultrafiltrácie, ktorú je možné uskutočniť v podobe dutých nití, pričom gama globulínový roztok preteká pod tlakom do 800 kPa vo vnútri nitovej membrány a cez póry v stene nitovej membrány prestupujú relatívne nízkomolekulárne látky vo vodnom roztoku do zbernej nádoby. Vzhľadom na to, že roztok gama globulínu sa pri ultrafiltrácii zakonzcentrováva prevedieme opätovné nariadenie s destilovanou apyrogénnou vodou a toto zakonzcentrovávanie, napríklad na polovičný objem a nariadenie na pôvodný objem prevádzame dovtedy pokiaľ je reakcia gama globulínového roztoku na prítomnosť chloroformu a etanolu pozitívna.

Ultrafiltráciu je možné realizovať aj v podobe kazetového systému, kde v rovinnom usporiadaní je alebo vymeniteľná membrána, alebo doska z umelej hmoty s definovanými veľkosťami pórov. Gama globulínový roztok pod tlakom do 800 kPa preteká, napríklad nad membránou a cez póry v stene rovínnej membrány alebo dosky z umelej hmoty prestupujú relatívne nízkomolekulárne látky vo vodnom roztoku do zbernej nádoby. Gama globulínový roztok sa v prípade potreby ďalej spracováva.

Sterilizácia ultrafiltračného zariadenia sa prevádza alebo parou alebo chemickou cestou, napríklad prepláchnutím aparatury vodným roztokom formalínu o koncentrácii do 50 g na liter a následným vymytím formalínu sterilnou destilovanou apyrogénnou vodou.

D.

Odstraňovanie relatívne nízkomolekulárnych zlúčenín do molekulárnej hmotnosti 50 000 je možné uskutočniť aj pomocou diafiltrácie čo je kombinácia dialýzy a ultrafiltrácie. Diafiltráciu je možné uskutočniť jednak v podobe dutých nití, pričom gama globulínový roztok preteká pod miernym tlakom do 200 kPa vo vnútri nitovej membrány a cez póry v stene nitovej membrány prestupujú relatívne nízkomolekulárne látky do z vonkajšej strany pretekajúceho roztoku

destilovanej apyrogénnej vody pri teplote 0 °C až +6 °C pri pH 4,0 až 8,0, ktorý nízkomolekulárne látky odplavuje od nitovej membrány do odpadu.

Diafiltráciu je možné realizovať aj v podobe kazetového systému, kde v rovinnom usporiadaní je alebo vymeniteľná membrána, prípadne doska z umelej hmoty s definovanou veľkosťou pórov. Gama globulínový roztok pod miernym tlakom do 200 kPa preteká, napríklad nad membránou a cez póry v stene rovinnnej membrány alebo poréznej dosky prestupujú reálne veľmi pomalým prietokom relatívne nízkomolekulárne látky do pretekajúceho roztoku destilovanej apyrogénnej vody, ktorá preteká, napríklad pod doskou alebo membránou a odplavuje nízkomolekulárne látky do odpadu.

Vzhľadom na to, že roztok gama globulínu sa pri diafiltrácii zakoncentrováva prevedieme opätovné nariadenie s destilovanou apyrogénnou vodou a toto zakoncentrovávanie, napríklad na polovičný objem a nariadenie na pôvodný objem prevádzame dovedy, pokiaľ je reakcia gama globulínového roztoku na prítomnosť chloroformu a etanolu pozitívna. Gama globulínový roztok sa preleje do zbernej nádoby a ďalej sa spracováva.

Sterilizácia diafiltráčného zariadenia sa prevádza alebo parou alebo chemickou cestou, napríklad prepláchnutím aparatury vodným roztokom formalínu o koncentrácii do 50 g na liter a nasledným vymytím formalínu sterilnou destilovanou vodou.

Dôkaz chloroformu sa prevádza Fujiwarovou reakciou (Fujiwara: Sitzber. Naturw. Ges. Rostock 6, 33, 1916), či už v pôvodnom usporiadaní alebo v novších aplikáciách podľa Seta a Schultzeho (Seto T. A., Schultze M. O.: Anal. Chem. 28, 1 625, 1956), Hildebrechta (Hildebrecht C. D.: Anal. Chem. 29, 1 037, 1957), Friedmana a Coopera (Friedman P. J., Cooper J. R.: Anal. Chem. 30, 1 674, 1958).

Ninhydrín pozitívne látky stanovujeme spôsobom podľa Ruhemanna (Ruhemann S.: J. Chem. Soc. 97, 1 438, 1910). Stanovenie etanolu sa prevádza Agulhonovou reakciou (Agulhon H.: Bull. soc. chim. France 4/4, 9, 881, 1911) či už v pôvodnom usporiadaní, alebo v novších aplikáciách podľa Kelletta (Kellett E. G.: Analyst 62, 728, 1937) alebo

Webba (Webb D. A.: Sci. Proc. Roy Dublin Soc. 21, 281, 1936).

Gama globulínový roztok po oddelení nízkomolekulárnych látok sa sterilizuje, napríklad filtráciou alebo inými metódami, a potom sa zakoncentrováva, napríklad lyofilizáciou alebo pomocou membrán, vákuovou destiláciou, vymrazovaním alebo inými metódami, a v prípade potreby sa podrobí ďalšiemu spracovaniu.

Použitie destilovanej apyrogénnej vody v porovnaní s použitím 0,1 %-ného až 3,0 %-ného roztoku chloridu sodného v destilovanej apyrogénnej vode je operatívnejšie a technologicky ľahšie realizovateľné. Umožňuje použiť horúcu destilovanú apyrogénnu vodu, ktorá priamo vytiekla z destilačného aparátu, po jej ochladení v prietokovom výmenníku tepla bezprostredne ku technologickej aplikácii, čím sa na minimum znižuje možnosť vzniku bakteriálnej kontaminácie. Použitie 0,1 %-ného až 3,0 %-ného roztoku chloridu sodného v destilovanej apyrogénnej vode vyžaduje nádobu na jeho zhotovenie a skladovanie pri zvýšenej teplote, vylučujúcej možnosť vzniku kontaminácie, ako aj zariadenie na zhomogenizovanie roztoku. Plynulý chod technologickej linky využívajúcej vodný roztok chloridu sodného vyžaduje minimálne 2 takéto nádoby.

Oddelovanie nízkomolekulárnych látok s molekulárnou hmotnosťou do 50 000 pomocou ultrafiltrácie, diafiltrácie, gélovej filtrácie alebo dialýzy, proti 0,1 %-nému až 3,0 %-nému roztoku chloridu sodného v destilovanej apyrogénnej vode bolo vyššie popísanými metódami taktiež úspešne odskúšané v technologickom merítku.

Príklad 2

Východzou surovinou môže byť bielkovinná pasta gama globulínu izolovaná aj pomocou iných metód. Bielkovinná pasta alebo bielkovinný roztok sa spracováva v ďalšom postupe podobne ako v prípade č. 1 s tým rozdielom, že kritérium odstránenia nízkomolekulárnych zlúčenín z roztoku gama globulínu nesúvisí s prítomnosťou liehu alebo chloroformu, ale s prítomnosťou precipitačnej látky, ktorá bola na oddelenie gama globulínu použitá alebo s gama globulínom vytvára prechodný rozrušiteľný komplex.

PREDMET VYNÁLEZU

1. Spôsob prípravy krvného gama globulínu so zníženým hypotenzívnym a antikomplementárnym účinkom spočívajúci v tom, že sa bielkovinný materiál obsahujúci purifikovaný gama globulín suspenduje za aseptických podmienok v takom množstve apyrogénnej destilovanej vody o teplote 0 °C až +6 °C, aby hodnota koncentrácie bielkovín sa nachádzala v rozmedzí 10 až 180 g/l, gama globulínový roztok sa vyčíri, napríklad filtráciou, oddelia sa nízkomolekulárne látky pomocou ultrafiltrácie, diafiltrácie, gélovej filtrácie alebo dialýzy, oproti roztoku chloridu sodného v destilovanej apyrogénnej vode, potom sa gama globulínový roztok sterilizuje, napríklad filtráciou a následne

sa zakoncentrováva, napríklad lyofilizáciou alebo pomocou membrán, vákuovou destiláciou, vymrazením a v prípade potreby sa podrobí ďalšiemu spracovaniu, vyznačujúci sa tým, že oddeľovanie nízkomolekulárnych látok s molekulovou hmotnosťou do 50 000 sa prevádza pomocou ultrafiltrácie, diafiltrácie, gélovej filtrácie alebo dialýzy, oproti destilovanej apyrogénnej vode.

2. Spôsob prípravy podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že bielkovinný materiál je normálna alebo hyperimúnnna plazma, prípadne normálne, retroplacentárne alebo hyperimúnnné sérum s definovanou antibakteriálnou, antitoxickou alebo antivírusovou protilátkovou aktivitou.