



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 208 555

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 14 03 79
(21) PV 1672-79

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³ A 61 K 39/395
// B 01 J 19/04
// C 01 B 31/08

(40) Zveřejněno 31 10 80
(45) Vydáno 01 12 83

(75)

Autor vynálezu ŠTĚPÁNEK IVAN Ing CSc., ŠARIŠSKÉ MICHAĽANY a
STACHY ALFRED MUDr., PREŠOV

(54) Způsob odstranění antikomplementární aktivity z roztoku krevního gama globulínu

1

Vynález se týká způsobu purifikace krevního gama globulínu, určeného pro terapeutické intravenosní podání.

Až dosud se příprava krevního gama globulínu pro terapeutické účely posuzovala podle kritérií pro intramuskulární aplikaci. Současný technologický zájem je už zaměřen na přípravu gama globulínu, vhodného pro intravenosní aplikaci.

V celosvětovém měřítku největšího rozšíření dosahla metoda izolace gama globulínu pomocí etanolu /Cohn E.J., Gurd F.N.R., Surgener D.M., Barnes B.A., Brown R.K., Derouaux G., Gillespie J.M., Kahnt F.W., Lever W.F., Liu G.H., Mittelman D., Mouton R.F., Schmid K., Uroma E.: J. Am. Chem. Soc. 72, 465, 1950; Deutsch H.F., Gestling G.L., Alberty R.A., Williams J.W.: J. Biol. Chem. 164, 109, 1946; Oncley J.L., Molin M., Rickert D.A., Cameron J.W., Gross P.M.: J. Amer. Chem. Soc. 71, 541, 1949; Nitschmann H.S., Kistler P., Lergier W.: Helv. Chim. Acta 37, 866, 1954; Kistler P., Nitschmann H.S.: Vox Sang. 7, 414, 1962; Taylor H.L., Bloom F.C., Mc Call K.B., Hyndman L.A., Anderson H.D.: J. Amer. Chem. Soc. 78, 1356, 1956/, která na jedné straně sice odděluje gama globulín od směsi jiných krevních bílkovin, ale na druhé straně zanáší do gama globulínového roztoku nízkomolekulární anorganické nebo organické sloučeniny, které v podmínkách technologického postupu mohou nežádoucími interakcemi část stopových příměsí s fyziologickou aktivitou vytvářet anebo koncentračně obohacovat, vzhledem k jejich koncentraci ve výchozí surovině, z které byl gama globulín izolován.

208 555

Přítomnost těchto stopových látek s fyziologickou aktivitou vytváří předpoklady pro vznik dalších nežádoucích interakcí těchto látek s molekulami bílkovin a to zejména při lyofilizaci nebo při skladování v injekčním roztoku, což snižuje kvalitu preparátu a omezuje rozsah jeho indikace v terapii.

Tuto nevýhodu těchto postupů se snaží odstranit výrobní postup podle předloženého vynálezu, kterým je možno odstranit v technologickém měřítku převážně nízkomolekulární sloučeniny s fyziologickou aktivitou ve stopových koncentracích z gama globulinového roztoku pomocí chemisorpce na aktivním uhlí.

Podstata vynálezu je odstranění balastních negamaglobulinových příměsí nízkomolekulární povahy převážně s fyziologickou aktivitou pomocí chemisorpční vazby na suspenzi aktivního uhlí, která se odstraní z bílkovinného roztoku.

Chemisorpční vlastnosti aktivního uhlí byly už použity na odstraňování nízkomolekulárních látek z krve při extrakorporálním oběhu jednak v pokusech na psech /Muirhead E., Reid A.: J. Lab. Clin. Med. 33, 841, 1948/ a po získání pozitivních výsledků se přikročilo k širokému zavedení kolonek z aktivního uhlí pro přímou perfuzi krve při extrakorporálním oběhu v klinické praxi v humánní medicíně za účelem eliminace nízkomolekulárních látek toxické povahy z krevního oběhu /Schechter D.C., Nealon T.F., Gibbon J.H.: Surgery 44, 892, 1958; Yatzidis H.: Nephron 1, 310, 1964; Dunea G., Kolff W.J.: Trans. Amer. Soc. Artif. Inter. Organs 11, 178, 1965; Hagstam K.E., Larsen L.E., Thysell H.: Acta Med. Scand. 180, 593, 1963; Andrade J.D., Kunimoto K., Lin D., Kolff W.J.: Fed. Proc. 30, 705, 1971; Andrade J.D., Kunimoto K., Van Wageden R., Kastigir B., Gough D., Kolff W.J.: Amer. Trans. Soc. Artif. Inter. Organs 17, 222, 1971; Chang T.M.: Canad. J. Physiol. Pharmacol. 47, 1043, 1969; Chang T.M.: Proc. Europ. Dial. Transplant. Ass. 9, 568, 1972; Chang T.M., Malave N.: Amer. Trans. Soc. Artif. Inter. Organs 16, 141, 1970; Chang T.M., Migchelson M.: Amer. Trans. Soc. Artif. Inter. Organs 19, 314, 1973/.

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

U nově navrhované technologie se tyto potíže nevyskytovaly v tak výrazné intenzitě, což lze dokumentovat tím, že z 10 připravených experimentálních šarží podle předloženého vynálezu bylo dosaženo snížení antikomplementární aktivity u lyofilizovaného preparátu o 70 až 95% ve srovnání s tímž materiálem, který byl lyofilizován bez předcházející separace nízkomolekulárních sloučenin z gama globulinu pomocí chemisorpce na aktivním uhlí.

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

Příklad 1

Výchozí surovinou je pasta frakce II, izolovaná metodou podle Cohna: Bílkovinný materiál se rozpouští v takovém množství destilované apyrogenní vody o teplotě 0 °C až +4 °C, aby koncentrace bílkovin se nacházela v rozmezí 2 % až 15 %, s optimem 8 % ± 2 %. Rozpouštění se urychluje mícháním. Po rozpouštění 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 +4 °C. Hodnota pH takto vzniklého gama globulinového roztoku bývá zpravidla mezi pH 5,8 až 6,2 a koncentrace bílkovin v rozmezí 8 % $\pm$ 2 %. Takto připravený roztok gama globulinu se vyčechá, například filtrací a převážně nízkomolekulární sloučeniny se z gama globulinového roztoku odstraní chemisorpcí na aktivním uhlí.

Po úpravě hodnoty pH gama globulinového roztoku na 7,0 až 7,8 například 0,5 M hydroxydem sodným nebo s 0,5 M kyselinou octovou v destilované apyrogenní vodě se přidává destilovanou vodou promytá a oddekantovaná suspenze aktivního uhlí v takovém množství při teplotě -2 °C až +2 °C, aby na 1 000 ml gama globulinového roztoku byl obsah suchého aktivního uhlí asi 40 gr.

Suspenze aktivního uhlí, s výhodou 40 gr vztaženo na suché aktivní uhlí, se smíchá s 1 000 ml gama globulinového roztoku při teplotě -2 °C až +2 °C 120 až 240 minut s výhodou při pH 7,0 až 7,8. Po uplynutí této doby se chemisorpčně vázaná forma nízkomolekulárních sloučenin s fyziologickou aktivitou na suspenzi aktivního uhlí odstraní z gama globulinového roztoku například centrifugací nebo filtrací. Takto purifikovaný roztok gama globulinu se podrobí sterilizaci, například filtrací a potom dalšímu zpracování, například lyofilizaci nebo zakoncentrování pomocí membrán nebo vakuové destilace.

Příklad 2

Výchozí surovinou může být pasta gama globulinu nebo roztok gama globulinu, izolovaný pomocí síranu amonného a hydroxydu hlinitého /Schultze H.E., Matheke H.D.: Behringwerke Mitt. 28, 9, 1954; Schultze H.E., Schönenberger M., Matheke H.D.: Behringwerke Mitt. 26, 21, 1952/, rivanolu /Hořejší J., Smetana R.: Acta Med. Scand. 155, 65, 1956/, síranu sodného /Amirajan K., Leikhim E.J.: J. Immunol. 87, 301, 1961/, chloridu hlinitého /Lewin J.: Therapie 9, 523, 1954/, DEAE celulozy /Sober H.A., Peterson E.A.: Fed. Proc. 17, 1116, 1958; Peterson E.A., Sober H.A.: J. Amer. Chem. Soc. 78, 756, 1956/, kyseliny kaprylové /Steinbuch M., Audran R.: Rev. Franc. D'étud. Clin. Biol. 14, 1054, 1969/, iontů Zn^{++} a Al^{+++} /Rejnek J., Škvařil F.: Coll. Czechoslov. Chem. Commun. 22, 1489, 1957; Rejnek J., Škvařil F.: Coll. Czechoslov. Chem. Commun. 23, 773, 1958/, polymetafosfátu /Nitschman H.S., Rickli R., Kistler P.: Vox Sang. 5, 232, 1960/ anebo éteru /Pennel R.B. v Putnam F.W./ed/ The Plasma Proteins, vol. I Academic Press-New York 1960, str. 9/.

Bílkovinný materiál se zpracovává v dalším postupu jako v příkladě 1 s tím rozdílem, že suspenze aktivního uhlí, s výhodou 30 až 50 gr, vztaženo na suché uhlí, se míchá s 1 000 ml gama globulinového roztoku při teplotě -2 °C až +2 °C 120 až 240 minut při hodnotě pH 5,0 až 9,0. Po uplynutí této doby se chemisorpčně vázaná forma nízkomolekulárních sloučenin s fyziologickou aktivitou na suspenzi aktivního uhlí odstraní z gama globulinového roztoku například centrifugací nebo filtrací.

Předmět vynálezu

1. Způsob odstranění antikomplementární aktivity z roztoku krevního gama globulinu pro intravenosní aplikaci, vyznačující se tím, že ku gama globulinovému roztoku o koncentraci bílkovin 2 % až 15 % při teplotě -2°C až $+2^{\circ}\text{C}$ při pH 5,0 až 9,0 se přidává vodní suspenze aktivního uhlí v množství 2 g až 80 g suchého aktivního uhlí na 1 000 ml gama globulinového roztoku, směs se míchá 120 až 240 minut, potom se suspenze aktivního uhlí s chemisorpčně navázanými balastními sloučeninami nízkomolekulární povahy odstraní z roztoku gama globulinu s výhodou centrifugací nebo filtrací a získaný gama globulinový roztok se sterilizuje, popřípadě dále zpracovává.
2. Způsob odstranění antikomplementární aktivity z roztoku krevního gama globulinu pro intravenosní aplikaci podle bodu 1, vyznačující se tím, že koncentrace bílkovin v gama globulinovém roztoku je 6 % až 8 %, pH roztoku je 7,0 až 7,8 a přidává se k němu destilovanou vodou promytá a oddekantovaná suspenze aktivního uhlí, obsahující 30 až 50 g suchého aktivního uhlí na 1 000 ml gama globulinového roztoku.
3. Způsob odstranění antikomplementární aktivity z roztoku krevního gama globulinu pro intravenosní použití podle bodu 1 a 2, vyznačující se tím, že po sterilizaci se roztok gama globulinu dále zpracuje lyofilizací nebo zahuštěním pomocí membrán anebo vakuovou destilací.