



Государственный комитет
СССР
по делам изобретений
и открытий

О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ

К ПАТЕНТУ

(11) 786854

(61) Дополнительный к патенту —

(22) Заявлено 26.01.78 (21) 2572351/28-13

(23) Приоритет — (32) 26.01.77

(31) 934/77 (33) Швейцария
Австрия

(51) М. Кл.³

A 61 K 35/14

Опубликовано 07.12.80. Бюллетень № 45

(53) УДК 611-018.
.54 (088.8)

Дата опубликования описания 07.12.80

(72) Авторы
изобретения

Иностранец
Маркус Радовиц
(ФРГ)

(71) Заявитель

Иностранная фирма
"Пласмеско АГ"
(Швейцария)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ
БЕЛКОВОЙ СЫВОРОТКИ

1

Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности и касается получения препарата на основе белковой сыворотки.

Известен способ получения препарата на основе белковой сыворотки путем фракционирования плазмы с последующей адсорбцией, очисткой и стерилизацией [1].

Однако известный способ не позволяет получить препарат с высоким содержанием иммуноглобулина.

Целью изобретения является повышение содержания иммуноглобулина.

Эта цель достигается тем, что плазму освобождают от продуктов коагуляции, фракционируют по способу Кона, из полученной после фракционирования фракции III выделяют фракции III-1 и III-11, последние смешивают с фракцией IV и суспендируют смесь в физиологическом растворе.

Способ осуществляют следующим образом.

Из плазмы удаляют сырой фибриноген, 53,3%-ный холодный этанол доводят до 8%-ной концентрации. При этом температуру поддерживают - 2,5-3,0°C. Осадок P₄-фибриноген удаляют центри-

2

трифугированием. Супернатант S₁ обрабатывают дальше.

Затем к выдержанному супернатанту S₁ опять добавляют 53,3%-ный этанол, концентрацию которого в жидкости устанавливают равной 18-25%. Температуру при этом поддерживают - 5°C, pH 5,8. Выделяется преципитат P₂, который обозначают фракцией III-11 -глобулина. Этот преципитат содержит иммунный глобулин и другие физиологически важные протеины. При температуре - 5°C преципитат удаляют путем центрифугирования. Супернатант S₂ подвергают дальнейшей обработке. Концентрацию этанола устанавливают 40%. Температуру на этой ступени поддерживают равной - 7°C, а pH 5,8. Осадок также центрифугируют (P₃) и его обозначают фракцией IV. Он содержит -ди P-глобулин.

Оставшуюся жидкость, супернатант S₃ затем обрабатывают далее.

На этой ступени поддерживают температуру - 7°C, pH 4,8. Концентрация этанола 40%. При этом выделяется преципитат P₄, так называемый сырой альбумин, который очищают и стерилизуют. Оставшуюся жидкость, супернатант S₄, выбрасывают.

5

10

15

20

25

30

γ -глобулиновую фракцию III-III обрабатывают далее следующим образом.

Осадок P_2 погружают в цитрат-фосфатный буфер с pH от 7,0 до 7,4, при температуре 15°C. Добавляют 3% полиэтиленгликоль 4000 (PE Y) или 2,5% PE Y 6000.

После реакции, продолжающейся от 30 мин до 4 час, смесь подают на центрифугу. Получают супернатант S_5 и фракцию III-I (осадок P_5).

Супернатант S_5 еще раз обрабатывают и фракционируют при pH 4,6, количество PE Y 4000 — около 5% при температуре -15°C). Получают фракцию III (осадок P_6), а также супернатант S_6 , который, главным образом, содержит иммунный глобулин. Глобулин фракции III-I и III значительно обогащен иммунными глобулинами IgG, IgA, IgM. Кроме того, он содержит -антитрипсин, α_2 -хаттоглобин, церулоплазмин, трансоферрин и хамопексин.

Фракции III-I и III далее не обрабатывают.

В качестве исходного продукта применяют как фракцию IV, так и фракции III-I и III.

Их смешивают в установленных соотношениях, причем в общих протеинах содержится от 50 до 70% альбумина или от 50 до 30% глобулина.

Также возможно путем соответствующего повышения добавки части глобулина или фракций III-I и III повысить долю глобулина IgM и IgA.

Фракции IV, III-I и III суспензируют в растворе поваренной соли или в другом пригодном буферном растворе, вес. %:

Фракция IV	30-80
Фракция III-I	0-70
Фракция III	0-70,

причем общее количество протеинов 100%.

Препарат на основе белковой сыворотки можно получать только из какой-либо одной из фракций III-I; III или IV и получить специфичные плаз, мопротейны из отдельных фракций в устойчивой, растворенной форме в качестве препарата. Препарат можно получить из смеси полученных конечных продуктов фракций III-I, III и IV.

Вещества, смешанные в определенных соотношениях и суспензированные в пригодном буферном растворе или в растворе поваренной соли, подвергают предварительной очистке. При предварительной очистке путем адсорбции на пригодных адсорбентах (аэрозил, бентонит или другие кремнийсодержащие комплексные соединения) удаляют липидные факторы α - и β -глобулинов. После этого продукт фильтруют, диализируют и устанавливают нужную концентрацию раствора.

Для устранения вирусов производят пастеризацию путем нагрева до 60°C

в течение 10 часов. Однако при этих условиях возможна денатурация протеинов сыворотки или же обрабатывают -пропиолактоном и ультрафиолетовыми лучами.

Способ поясняется следующими примерами.

Пример 1. К 300 л раствора поваренной соли (дистиллированная вода с 1,7% по весу NaCl, который получают в помощью 6,2 н. HCl с pH 4,6) добавляют 10 кг СОНН фракции IV со следующим анализом белка и суспендируют, %:

Альбумина	55
α_1 -Глобулина	10
α_2 -Глобулина	8
β -Глобулина	15
γ -Глобулина	12

Фракция IV содержит около 50% твердых веществ (белок, соль) и 50% влажного остатка (H_2O , остаточный этанол).

Далее добавляют 5 кг СОНН фракции III-I (субфракция) со следующим анализом твердых составляющих, вес. %:

Альбумина	15
α_1 -Глобулина	2
α_2 -Глобулина	13
β -Глобулина	17
γ -Глобулина	53

и 5 кг СОНН субфракции III-2 со следующим анализом суспензируется, вес. %:

Альбумина	8
α_1 -Глобулина	3
α_2 -Глобулина	9
β -Глобулина	25
γ -Глобулина	55

Соотношение твердого вещества и влажного остатка во всех фракциях практически одинаковое.

20 кг флажной фракции суспензируют в растворе и перемешивают. При этом значение pH поддерживают постоянным и равным 4, 6. Растворимая субстанция, имеющаяся в растворе, растворяется. Имеющаяся нерастворимая субстанция дает помутнение раствора и составляет около 12% по отношению к всему количеству твердых составляющих. Среди нерастворимых веществ имеются, в частности, денатурированные глобулины, включая липопротеиды, которые на дальнейших ступенях способа не нужны. Последние удаляют путем центрифугирования.

Оставшаяся жидкость имеет слабую мутность и желтоватый цвет.

Добавляют 0,2 NaOH, устанавливая значение pH на 7,4. В раствор добавляют чистую коллоидную кремниевую соль до достижения концентрации 5 вес. % и все перемешивают. Жидкость подогревают до 45°C (около 1 в минуту) и значение pH поддерживают постоянным. После достижения температуры 45 С жидкость перемешивают в течение 4 часов. Во время процесса длительноустойчивые протеины

соединяются с кремниевой кислотой и образуют осадок, который удаляют центрифугированием.

Жидкость, оставшуюся после центрифугирования, осветляют при пропускании ее через фильтр с активированным углем. После этого фильтрат становится прозрачным янтарного цвета. Далее жидкость концентрируют до 25% по отношению к исходному объему с помощью способа диаконцентрации (миллипоры — кассетная система, мембрана — величина пор 10.000 дальтон). После этого концентрация белка в растворе составляет 3,4-4,5 вес. %.

Анализ показывает, что благодаря диаконцентрационной ступени все фракции, составляющие кровь с молекулярным весом, меньшим 10.000, из концентрата удаляют. К ним принадлежат фракции, которые нежелательны для консервирования, например олигопептиды с вазоактивным действием.

После этого для окончательного удаления примесей, а также электролитического установления диализа, обработку ведут трехкратным раствором, 0,9%-ного NaCl. Диализ проводят в одинаковых аппаратах с одинаковыми мембранами, которые применяют при концентрировании.

Последующее концентрирование заканчивают установлением концентрации протеина 6-10%. После этого с помощью раствора NaCl устанавливают физиологические условия изотонии, присущие человеческой крови, и общая концентрация протеинов становится равной 5%.

Анализ полученных в примере 1 протеинов показал следующие значения, мг:

	(содержание в 100 мл)
Протейн	5.000
Альбумин	2.925
Ig G	1.500
Ig A	380
Ig M	285

Полученный раствор фильтруют дополнительно через стерилизующие фильтры. Благодаря мембранным фильтрам происходит стерильная фильтрация.

После этого препарат готов для внутривенной инъекции.

Пример 2. В 300 л раствора, как и в примере 1, растворяют, кр: 7,5 СОНН фракции IV
4 СОНН фракции III-I
8 СОНН фракции III

Состав этих фракций соответствует примеру 1. Фракции перемешивают с растворителем, значение pH поддерживают 4,6. В раствор добавляют 60 г на литр аэрозола и значение pH устанавливают равным 7,6 и смешивают при температуре 47°C в течение 4 часов, после этого раствор охлаждают до 18°C и гидравлически фильтруют. Гидравлическую фильтрацию производят в намыв-

ных фильтрах, тип CNF-S. В качестве фильтровального средства используют Nyflo Super Cel 8%-ной концентрации на общее количество фильтрата. В качестве фильтровального средства можно применять также кизельгур целит 545 в 5%-ной концентрации.

Пример 3. После очистки растворы разделяют и подвергают обработке способом диаконцентрирования, как в примере 1. Их можно при желании обрабатывать до получения конечного концентрата по способу, описанному в примере 1, и после этого по выбору соединять в любой состав.

Пример 4. В 200 л фосфатно-цитратного буферного раствора (0,66 моль фосфат-цитрата) растворяют 10 кр фракции III в течение 3 часов. Значение pH устанавливают 7,5 и после последующего разбавления в 300 л перемешивают с упомянутым буферным раствором при добавлении 100 г/л аэрозил/бентонита (2:1) в течение 4 часов при 45°C. После охлаждения до 10°C суспензию фильтруют на намывном фильтре через фильтр, в качестве которого применяют кизельцелит 545, количество которого на 1 м² фильтровальной поверхности составляет 1,0 кг, причем мощность фильтра 50 л/м² час. Фильтрация происходит как и диаконцентрирование в примерах 1-3. Раствор готового конечного концентрата содержит 5% белка. При этом средний состав следующий, мг:

Протейн	5000
Альбумин	Около 1800-2000
Глобулин	3000-3200
Ig G	Около 1450
Ig A	Около 700
Ig M	Около 500

Пример 5. СОНН фракции I-III и IV-I с концентрацией этанола 40% и со значением pH 5,8 выделяют в ступени. Под фракцией IV-I следует понимать фракцию, идентичную фракции IV.

Осадок изолируют 20 кг преципитата, как и в примере 1 погружают в 300 л растворителя и далее обрабатывают.

Пример 6. Фракционирование человеческой плазмы производят с помощью риванола (2-этокси-6,9-диамино-ацидинилацетат), при этом выпадают осадки II, III и IV. Эти осадки можно по предлагаемому способу обрабатывать до получения препарата белковой сыворотки. По 10 кр каждого осадка, т.е. вместе это составляет 30 кр, вносят в 300 л растворителя, как и в примере 1. Дальнейшую обработку производят также, как и в примере 1.

Пример 7. В 200 л раствора поваренной соли (дистиллированная вода с 1,7 вес. % NaCl, у которой ве-

личина pH при помощи 0,2 н. НСР установлена в 4,6 и которая ниже называется растворителем) добавляют 6,0 кр СОНН фракции IV со следующим анализом компонентов белка и суспендируют, вес. %:

Альбумина	53
α_1 -Глобулина	11
α_2 -Глобулина	8
β -Глобулина	14
Гаммаглобулина	14

Затем добавляют 4,0 кр СОНН подфракций III со следующим анализом белковых компонентов, вес. %:

Альбумина	7
α_1 -Глобулина	3
α_2 -Глобулина	9
β -Глобулина	26
Гаммаглобулина	56

Соотношение остаточной влажности (H_2O , остаточный этанол) и твердых веществ (белки, соли) составляют около 1:1.

10 кр влажной фракции суспендируют в растворителе и размешивают. При этом величину pH поддерживают постоянно 4, 6. Следующие стадии протекают, как описано в примере 1 (центрифугирование; обработка кремневой кислотой, фильтрование на активном угле, концентрирование диализом).

На 100 мл раствора при 5.000 мг установленного содержания протеина

получают около 37% альбумина, соответственно 1850 мг, около 63% глобулинов, соответственно 3150 мг, содержание иммунных глобулинов, мг:

IgG	Около 1.450
IgA	Около 700
IgM	Около 500

Предлагаемый способ позволяет получить препарат на основе белковой сыворотки с повышенным содержанием иммуноглобулина.

Формула изобретения

Способ получения препарата на основе белковой сыворотки путем фракционирования плазмы с последующей адсорбцией, очисткой и стерилизацией, отличающийся тем, что, с целью повышения содержания иммуноглобулина, плазму освобождают от продуктов коагуляции, фракционируют по способу Кона, из полученной после фракционирования фракции III выделяют фракции III-I и III-II, последние смешивают с фракцией IV и суспендируют смесь в физиологическом растворе.

Источники информации, принятые во внимание при экспертизе, 1. W. Stephan - Vox Sanguinis, 442-457, 1975.

Составитель С. Малютин

Редактор В. Смирягина

Техред Т. Маточка

Корректор О. Ковинская

Заказ 8872/63

Тираж 673

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР

по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Филиал ППП "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4