



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

202 182

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 16 11 77
(21) PV 7540-77

(51) Int. Cl.³ A 61 K 39/395

(40) Zveřejněno 30 04 80

(45) Vydáno 01 04 83

(75)

Autor vynálezu ŠTĚPÁNEK IVAN Ing CSc., ŠARIŠSKÉ MICHAĽANY

(54) Způsob odstraňování nízkomolekulárních sloučenin z roztoku krevních imunoglobulinů skupiny G, A, M.

1

Poznání skutečnosti, že imunoglobuliny skupiny G, A, M jsou zodpovědné za protilátkovou aktivitu způsobilo zaměření pozornosti na přípravu terapeutického preparátu gama globulinu, který obsahuje imunoglobuliny skupiny A nebo skupiny M, případně směs imunoglobulinů A a M.

Základní podmínkou pro klinickou efektivnost účinku imunologického preparátu je co nejnižší hodnota antikomplementární aktivity, která souvisí s obsahem nízkomolekulárních anorganických nebo organických sloučenin, které se do roztoku imunoglobulinů skupiny G, A, M dostávají v souvislosti s jejich technologickou formou separace. Vynález řeší způsob odstraňování těchto nízkomolekulárních sloučenin z roztoku imunoglobulinů skupiny G, A, M, který může být použit jak pro intramuskulární, tak i pro intravenózní aplikaci.

Na precipitaci balastních bílkovin ze směsi imunoglobulinů skupiny G, A, M byl použit síran amonný a rivanol/Schwick H.G., Fischer J., Geiger H.: Progr. Immunobiol. Stand. 4, 86, 1970; Schwick H.G.; Vox Sang. 23, 82, 1972/, kyselina bórítá/pejaudier L., Audran R., Steinbuch M.: Vox Sang. 23, 165, 1972/ a kyselina kaprylová/Blatrix C., Israël J., Reinert Ph., Griscelli C., Steinbuch M.: La Nouvelle Presse Medicale 5, 1193, 1976/.

Současná technologická praxe však na jedné straně sice odděluje gama globulin a imunoglobuliny skupiny A a M od směsi jiných krevních bílkovin, ale na druhé straně zanáší do roztoku imunoglobulinů skupiny G, A, M nízkomolekulární anorganické nebo organické sloučeniny.

Technologický postup může taktéž část některých nízkomolekulárních sloučenin s bio-

202 182

chemicko-fysiologickou aktivitou v roztoku imunoglobulinů skupiny G,A,M koncentrovat, tj. obohacovat vzhledem k jejich koncentraci ve výchozí surovině, z které byly imunoglobuliny skupiny G,A,M izolovány.

Přítomnost netěkavých anorganických solí, jakož i přítomnost nízkomolekulárních organických sloučenin v roztoku imunoglobulinů skupiny G,A,M vytváří předpoklady pro vznik nežádoucích interakcí těchto látek s molekulami imunoglobulinů skupiny G,A,M, a to zejména při lyofilizaci nebo při skladování v injekčním roztoku, což může snižovat kvalitu preparátu a popřípadě omezovat rozsah jeho aplikace 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 Kabat-Mayera /Kbat E.A., Mayer M.M.: Experimentální imunochemie ČSAV, Praha 1965, str. 180/.

U nově navrhované technologie se tyto potíže nevyskytovaly v tak výrazné intenzitě, 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 se stejným materiálem, který byl lyofilizován bez předcházející separace nízkomolekulárních sloučenin.

Podstata odstraňování nízkomolekulárních anorganických nebo organických sloučenin spočívá podle předloženého vynálezu v tom, že bílkovinný materiál, obsahující imunoglobuliny skupiny G,A,M 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 1 % až 15 %, s optimem $8\% \pm 2\%$, roztok imunoglobulinů se vyčerpá filtrací a separace nízkomolekulárních sloučenin se provede z roztoku imunoglobulinů eluční chromatografií s vylučovací mezí gelu, vyjádřenou molekulovou hmotností nízkomolekulárních sloučenin do 10 000, pomocí eluce s 0,1%ním až 3,0%ním roztokem 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 0,01 ml až 3,0 ml za minutu na cm^2 výtokové plochy gelové části kolony. Za optimální průtok je možno považovat objem v rozmezí od 0,05 ml do 1,0 ml za minutu na cm^2 , kdy vzniká naředění na čele a konci výtoku bílkoviny z kolony, při čemž cca 80 % naloženého objemu roztoku bílkovin vytéká z kolony prakticky v té koncentraci, v jaké byl roztok bílkovin na kolonu nasazen. Průtoky kolem 5 ml za minutu na cm^2 /Friedli H., Kistler P.: Chimia 26, 25, 1972/ způsobují naředění roztoku na více než dvojnásobný objem.

Z gelové-chromatografické kolony vyteklý roztok imunoglobulinů skupiny G,A,M se podrobí sterilní filtraci nebo radiační sterilizaci, rozplňuje se a v případě potřeby se lyofilizuje.

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

Příklad 1

Výchozí surovinou je bílkovinná pasta precipitátů imunoglobulinů skupiny G,A,M, získaná způsobem podle Pejaudiera a spol. /Pejaudier L., Audran R., Steinbuch M.: Vox Sang. 23, 165, 1972/ Bílkovinný materiál vyprecipitovaných imunoglobulinů se rozpouští v takovém množství desti-

lované apyrogenní vody o teplotě 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$, aby hodnota koncentrace bílkovin se nacházela v rozmezí 1 % až 15 % s optimem 8 % $\pm$ 2 %. Rozpouštění se urychluje mícháním. Po rozpouštění se roztok imunoglobulinů skupiny G,A,M vyčepí, například filtrací.

V technologických poměrech jsou výše uvedené podmínky zpravidla zachovány tehdy, když rozpouštíme 1 kg bílkovinné pasty imunoglobulinů skupiny G,A,M ve 2 000 ml destilované vody, testované na apyrogenitu, o teplotě 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$. Hodnota pH takto vzniklého imunoglobulinového roztoku skupiny G,A,M bývá zpravidla mezi 4,0 až 7,0 a koncentrace bílkovin v rozmezí 8 % $\pm$ 2 %.

Takto připravený roztok se vyčepí například filtrací a nízkomolekulární sloučeniny se z roztoku odstraní eluční gelovou chromatografií například na dextranových gelech, pod komerčním označením Sephadex G-25; G-50, na polyakrylamidových gelech, pod komerčním označením Biogel P-2; P-4; P-6, na metakrylátových gelech pod komerčním označením Spheron P-40 nebo na jiných materiálech, jako jsou například domácí vývojové materiály na bázi řetězového škrobu s epichlorhydrinem nebo na bázi perlové celulózy, s vylučovací mezí gelu, vyjádřenou molekulovou hmotností nízkomolekulárních sloučenin do 10 000, přičemž uvedené materiály je nutno používat v optimálním zrnění, zaručujícím průtok pro technologické podmínky.

Nabobtnalý gel, promytý apyrogenním 0,45%ním až 0,9%ním roztokem chloridu sodného v destilované vodě o teplotě 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$ se plní do chromatografické kolony. Za optimální rozměry technologické gelové chromatografické kolony se považují takové, kde průměr kruhové nebo uhlopříčka čtvercové nebo obdélníkové základní plochy se pohybuje v poměru 1:5 až 1:10.

Do kolony necháme nasávat imunoglobulinový roztok takovou rychlostí, aby průtok spodní plochou kolony se pohyboval mezi 0,01 ml až 3,0 ml, s optimem 0,05 až 1,0 ml za minutu na cm^2 . Množství imunoglobulinového roztoku, naneseného na kolonu, nemá překročit 25 % až 30 % objemu gelové části chromatografické kolony.

Po nasazení celého objemu imunoglobulinového roztoku se chromatografická kolona promývá 0,1%ním až 3,0%ním roztokem chloridu sodného v apyrogenní vodě, s optimem 0,45 % až 0,9 % chloridu sodného o teplotě 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$ při zachování stejné průtokové rychlosti. Po výtoku imunoglobulinového roztoku, zbaveného nízkomolekulárních sloučenin se gelové chromatografická kolona promývá rychlostí 0,3 ml až 0,6 ml za minutu na cm^2 minimálně 10ti násobkem objemu své gelové části s 1 M roztokem chloridu sodného v apyrogenní destilované vodě. Potom se chromatografická kolona promyje minimálně 15ti násobkem objemu gelové části s apyrogenní vodou o teplotě 0°C až $+6^{\circ}\text{C}$, přičemž lze oddělování nízkomolekulárních sloučenin z roztoku imunoglobulinů skupiny G,A,M na gelové-chromatografické koloně po ekvilibrizaci s 10ti násobkem objemu gelové části s 0,1 %ním až 3,0%ním roztokem chloridu sodného v destilované apyrogenní vodě, s optimem 0,45% až 0,9 % opakovat.

Roztok imunoglobulinů skupiny G,A,M po eluci z gelové chromatografické kolony se zpravidla sterilizuje filtrací nebo radiační sterilizací, rozplní se a podrobí se dalšímu zpracování, například lyofilizaci.

Numerické hodnoty, uváděné jako optima, jsou vhodné pro technologické provedení, které bylo úspěšně odzkoušeno.

202 182

Příklad 2

Výchozí surovinou může být bílkovinná pasta imunoglobulinů skupiny G,A,M, izolovaná i pomocí síranu amonného a rivanolu, anebo pomocí kyseliny kaprylové. Bílkovinná pasta se zpracovává v dalším postupu jako v příkladě 1.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob odstraňování nízkomolekulárních sloučenin z roztoku krevních imunoglobulinů skupiny G,A,M, vyznačující se tím, že bílkovinný materiál, obsahující imunoglobuliny skupiny G,A,M 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 1 % až 15 %, roztok imunoglobulinů se vyčerpá filtrací a seprace nízkomolekulárních sloučenin se provádí z roztoku imunoglobulinů eluční chromatografií s vylučovací mezí gelu, vyjádřenou molekulovou hmotností nízkomolekulárních sloučenin do 10 000, pomocí eluce s 0,1%ním až 3,0%ním roztokem 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 0,01 ml až 3,0 ml za minutu na cm^2 výtokové plochy gelové části kolony, při čemž z gelově-chromatografické kolony vytekly roztok imunoglobulinů skupiny G,A,M se sterilizuje filtrací nebo radiační sterilizací, rozplní se a podrobí se dalšímu zpracování, například lyofilizaci.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že výchozí bílkovinný materiál se suspenduje na hodnotu koncentrace bílkovin v rozsahu 6 až 10 %.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že gelově chromatografická eluce se provádí s 0,45 až 0,9%ním roztokem chloridu sodného při průtoku 0,05 až 1,0 ml za minutu na cm^2 výtokové plochy gelové části kolony.