



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

255356
(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
A 61 K 31/395

(22) Prihlášené 05 10 84
(21) [PV 7531-84]

(40) Zverejnené 16 07 87

(45) Vydané 15 11 88

(75)

Autor vynálezu

ŠTĚPÁNEK IVAN ing. CSc., ŠARIŠSKÉ MICHALANY

(54) Spôsob prípravy krvného zvieracieho savčieho gama globulínu pre i.v. podanie

1

Vynález sa týka spôsobu prípravy krvného zvieracieho savčieho gamaglobulínu pre i. v. podanie, z normálnej alebo hyperimunej plazmy prípadne z normálneho alebo retroplacentárneho prípadne hyperimunného séra, ktorý je určený pre terapeutické účely.

Súčasná situácia priemyselnej produkcie mäsa, mlieka a kožušín zmenila životné podmienky chovných zvierat od narodenia až po dosiahnutie jatočnej hmotnosti. Nesprávna výživa zvieracích samíc a nie vždy dostatočná starostlivosť o novonarodené mláďatá ovplyvňujú životnosť a imunologickú odolnosť voči bakteriologickým alebo virologickým infekciám.

Mechanizmus imunitnej obranyschopnosti sa mimo iného opiera o systém nešpecifických obranných mechanizmov, medzi ktoré môžeme zahrnúť systém komplementu, ako aj systém špecifickej imunity, kde môžeme zaradiť imunoglobulínový systém.

Prenos imunoglobulínov vo vzťahu samica — mláďa a saturácia krvného séra mláďaťa imunoglobulínami po narodení je predovšetkým závislá od včasného podania kolostra v dostatočnom množstve. Podľa Klaus-
sa a spol. [Klauss G. G. B., Bennet A., Jones E. V.: Immunology 16, 293, 1969] dochádza aj pri optimálnej kolostrálnej výžive ku vý-

2

skytu imunodeficientného stavu u 20 % teľiat. Zistenia našich autorov publikované v 1983 uvádzajú však rozdielne údaje. Normálny obsah imunoglobulínov malo podľa Kudlača a spol. [Kudlač E., Schulz J., Vedral V., Vollhardt V.: Veterinárni medicína 28, 7, 401, 1983] iba 24 % a podľa Paulika a spol. [Paulik Š., Slanina L., Bomba A., Poláček M.: Veterinárni medicína 28, 11, 669, 1983] iba 30 % novonarodených teľiat.

Jednou z hlavných príčin úhynu teľiat bol prevažne pozitívny bakteriologický nález a nízky obsah imunoglobulínov u uhynulých kusov [Horyna B., Draganov D.: Veterinárni medicína 25, 9, 537, 1980; Horyna B., Lavíčka M., Kabelík V., Krpata V.: Veterinárni medicína 25, 9, 545, 1980].

Hladina imunoglobulínov navyše kolíše v závislosti na čase od podania kolostra u teľiat [Vajda V., Slanina L.: Veterinárni medicína 25, 9, 527, 1980] a žriebat [Komárek J., Hamáčková J.: Veterinářství 34, 5, 209, 1984] pričom bol pozorovaný aj sezónny pokles imunoglobulínov v krvi v období február — máj a vzostup v období máj — október.

Využívanie doterajších poznatkov sa začalo realizovať tým spôsobom, že imunologická odolnosť zvieracích savčích mláďat sa zvyšuje v období výskytu znížených hla-

dín imunoglobulínov podávaním homológnych imunoglobulínov prevažne i. m. cestou.

Pri podávaní homológneho gamaglobulínového preparátu i. m. cestou si musíme uvedomiť, že preparáty tohoto typu majú zpravidla vysokú antikomplementárnu aktivitu, ktorá môže ovplyvňovať nešpecifickú imunitu blokovaním komplementového systému, v dôsledku čoho môže byť ohrozený terapeutický efekt tých imunoglobulínov, ktoré ku svojej činnosti potrebujú komplement.

Táto skutočnosť by dokázala vysvetliť popisovaný kladný terapeutický účinok hovädzieho i. m. gamaglobulínu ako ho popisuje Tluchoň a Komarek (Tluchoň V., Komarek J.: Veterinářství 33, 5, 221, 1983) a nie celkom terapeuticky presvedčivý účinok gamaglobulínového i. m. preparátu od toho istého výrobcu ako ho popisuje Jílek a spol. (Jílek F., Dobšínský O., Novotný B.: Veterinářství 33, 5, 218, 1983), ktorí použili dvojnásobnú dávku ako Tluchoň a Komarek.

Až doposiaľ sa realizuje príprava zvieracích savčích gamaglobulínov 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. Preparáty tohoto typu majú dlhú dobu vstrebateľnosti a zpravidla vykazujú antikomplementárnu a hypotenzívnu aktivitu.

Na precipitáciu gamaglobulínu zo zmesi zvieracích plazmatických alebo sérových bielkovín môže byť použitý síran amonný 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, 1116, 1958; Peterson E. A., Sober H. A.: J. Am. Chem. Soc. 78, 756, 1956; Fahey J. L., Herbert A. P.: J. Biol. Chem. 234, 2645, 1959; Stanworth D. H.: Nature 188, 156, 1960), kyselina kaprylová (Steinbuch M., Audran R.: Rev. Franc. D'étud. Clin. Biol. 14, 1054, 1969), ionty Zn^{++} a Al^{+++} (Rejnek J., Švařil F.: Coll. Czechoslov. Chem. 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), polymetafosfát (Nitschman H. S., Rickli R., Kistler P.: Vox Sang. 5, 232, 1969), éter (Pennell R. B. v Putnam F. W.) ed (The Plasma Proteins vol I Academic Press New York 1960, str. 3) 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., Meilin 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., Hydman L. A., Anderson H. D.: J. Am. Chem. Soc. 78, 1356, 1956).

Preparáty gamaglobulínu z homolognej savčej krvnej plazmy alebo séra pripravené podľa doterajších kritérií pre i. m. podanie majú zpravidla hypotenzívny a antikomplementárny účinok čo je pre kvalitu intravenózných preparátov neprípustné. Podanie preparátu týchto kvalít intravenózne môže v dôsledku náhleho poklesu krvného tlaku zviazať ohroziť a v dôsledku antikomplementárnej aktivity oslabiť jeho nešpecifickú obranu.

Napriek tomu, že hypotenzívny účinok pri intramuskulárnom podaní nemá taký priebeh ako pri intravenóznom podaní, možno ho označiť spolu s vysokým antikomplementárnym účinkom za vlastnosti nežiaduce pre preparáty savčieho gamaglobulínu, ktoré sú určené pre terapeutické účely či už pre intramuskulárne alebo pre intravenózne podanie.

Na odstraňovanie antikomplementárnej aktivity gamaglobulínu, ktorý bol pripravený zo zmesi savčích plazmatických alebo sérových bielkovín pri zachovaní homológnosti môže byť použitá úprava hodnoty pH na 4,0 pri 24 hodinovej inkubácii pri 37 stupňoch Celzia (Barandun S., Kistler P., Jeunet F., Isliker H.: Vox Sang. 7, 157, 1962).

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

Znižovanie antikomplementárnej aktivity gamaglobulínového 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.: 28, 157, 1975).

Antikomplementárnu aktivitu gamaglobulínovej molekuly je možné znížiť jej chemickou redukciou beta merkaptóetanólom (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, 262, 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 (Schidttberger 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 etylén-oxidu (Schroeder D. D., Tankersley D. L., Lundblad J. L.: *Vox Sang.* 40, 373 1981).

Antikomplementárna aktivita savčieho gamaglobulínu súvisí jednak so vznikom polymerov gamaglobulínu, ktoré môžu vzniknúť v procese technologickej izolácie a jednak vzniká v procese lyofilizácie v dôsledku interakcie nízkomolekulárnych látok s molekulami gamaglobulínu. Použitie destilovanej apyrogennej vody pri separácii nízkomolekulárnych látok z gamaglobulínu jednak spôsobuje precipitáciu najmä vyšších polymerov gamaglobulínu a jednak odstránenie nízkomolekulárnych látok v dôsledku čoho pri lyofilizácii nemôže dôjsť ku ich interakcii s molekulami gamaglobulínu, čiže nedochádza ani ku vzniku antikomplementárnej aktivity. Použitie vodného roztoku chloridu sodného, v koncentrácii do 30 g na liter, zaručuje polymérom gamaglobulínu 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 gamaglobulínového preparátu bol stanovený metódou podľa Kabata a Mayera (Kabata E. A., Mayer M. M.: *Experimentální imunochémie ČSAV, Praha 1965 str. 180*).

Efekt destilovanej apyrogennej vody pri odstraňovaní antikomplementárnej aktivity je možné dokumentovať u 5 experimentálnych šarží gamaglobulínu, ktorý bol izolovaný z frakcie III podľa Cohna a Oncleya. Pokiaľ bola použitá samotná destilovaná voda, bolo dosiahnuté zníženie antikomplementárnej aktivity gamaglobulínu po lyofilizácii o 80 až 95 %. Použitie vodného roztoku chloridu sodného, za použitia toho istého gamaglobulínového materiálu, v koncentrácii do 30 g na liter spôsobí o zníženie antikomplementárnej aktivity gamaglobulínu po lyofilizácii iba o 30 % až 45 %. Pokiaľ niesu v roztoku gamaglobulínu prítomné jeho vyššie polyméry, sú výsledky testovania antikomplementárnej aktivity v lyofilizovanom gamaglobulínovom preparáte, z ktorého boli odstraňované nízkomolekulárne látky za použitia destilovanej apyrogennej vody alebo za použitia vodného roztoku

ku chloridu sodného do 30 gramov na liter prakticky rovnaké.

Hypotenzívny účinok bol testovaný na základe poklesu krvného tlaku králiku priamou krvnou metódou podľa ČSL 3 (ČSL 3, sväzok I, vydanie III, Avicenum Praha 1970 str. 149) s tým, že králikovi o hmotnosti 2 až 3 kg sa aplikujú 2 ml gama globulínového roztoku na kg hmotnosti. Obsah gama globulínu v aplikovanom roztoku je 50 gramov na 1000 ml roztoku. U preparátov pripravených podľa navrhovaného postupu sa hypotenzívna aktivita nevyskytovala v tak výraznej intenzite, čo je možné dokumentovať údajom, že z 5 pripravených experimentálnych šarží podľa predloženého vynálezu bol stanovený pokles systolického tlaku maximálne o 4 až 8 % v porovnaní s tým istým materiálom v tej istej dávke bez separácie nízkomolekulárnych zlúčenín, kde bol stanovený pokles systolického prvého tlaku od 20 do 30 %.

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

Odstránenie balastných negamaglobulínových prímiesí je možné previesť:

- 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, polyakryl amidových gélov, pod označením Biogel, hydroxyalkylmetakrylátových gélov, pod označením Spheron, polystyrénových gélov, pod označením Styragel, polyvinylacetátových gélov, pod označením Merskogel, poréznych silikátov, pod označením Porasil, a poréznych skiel pod označením Bioglas, ktoré majú odstupňované veľkosti pórov v gélových časticách a umožňujú gélovú filtráciu v pomerne širokých rozmedziach molekulárnych hmotností.

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 rovinných membrán alebo v podobe potrubia o menlivom priemere a menlivej veľkosti pórov na báze regenerovanej celulózy alebo jej derivátov, prípadne na báze kolódií a taktiež na báze vinylových polymérov.

C. Separácia nízkomolekulárnych zlúčenín do molekulovej hmotnosti 50 000 sa mô-

že uskutočniť aj pomocou ultrafiltrácie, ktorú možno realizovať v podobe dutých níí pričom gamaglobulínový roztok preteká pod tlakom do 800 kP vo vnútri nítovej membrány a cez póry v stene nítovej membrány prestupujú nízkomolekulárne látky v vodnom roztoku do zbernej nádoby.

Ultrafiltráciu je možno realizovať aj v podobe kazetového systému kde v rovinnom usporiadaní je alebo vymeniteľná membrána alebo doska z umelej hmoty s definovanými veľkosťami pórov. Gamaglobulínový roztok pod tlakom do 800 kP preteká napríklad nad membránou a cez póry v stene rovinatej membrány alebo dosky z umelej hmoty prestupujú relatívne nízkomolekulárne látky vo vodnom roztoku do zbernej nádoby.

D. Odstraňovanie relatívne nízkomolekulárnych zlúčenín do molekulárnej hmotnosti 50 000 je možno uskutočniť aj pomocou diafiltrácie, čo je kombinácia dialýzy a ultrafiltrácie. Diafiltráciu je možné realizovať jednak v podobe dutých níí pričom gamaglobulínový roztok preteká pod tlakom do 200 kP vo vnútri nítovej membrány a cez póry v stene nítovej membrány prestupujú reálne nízkomolekulárne látky do z vonkajšej strany pretekajúceho roztoku, ktorý relatívne nízkomolekulárne látky odplavuje od nítovej 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. Gamaglobulínový roztok pod miernym tlakom do 200 kP preteká napríklad nad membránou a cez póry v stene rovinatej membrány alebo poréznej dosky prestupujú reálne veľmi pomalým prietokom relatívne nízkomolekulárne látky do pod membránou pretekajúceho roztoku, ktorý odplavuje relatívne nízkomolekulárne látky do odpadu.

Východziu surovinou môže byť pasta frakcie II izolovaná metódou podľa Cohna a Oncleya z normálnej alebo hyperimunej savčej plazmy prípadne z normálneho alebo retroplacentárneho prípadne hyperimunej séra savcov. Taktiež však môžu byť použité bielkovinné gamaglobulínové 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 urýchluje miešaním. Po rozpustení sa gamaglobulínový roztok vyčíri napríklad filtráciou.

V technologických pomeroch sú vyššie uvedené optimálne podmienky zachované vtedy ak rozpúšťame 1 kg gamaglobulínovej pasty v 2 000 ml destilovanej apyrogénnej vody o teplote 0 °C až +6 °C. Hodnota pH takto pripraveného gamaglobulínového

roztoku býva zpravidla v rozmedzí pH 4,0 až 8,0 a koncentrácia bielkovín v rozmedzí 60 až 100 gramov na liter. Takto pripravený roztok gamaglobulínu sa vyčíri napríklad filtráciou a nízkomolekulárne zlúčeniny do 50 000 molekulárnej hmotnosti sa odstránia napríklad gélovou filtráciou, dialýzou, ultrafiltráciou alebo diafiltráciou pomocou elúcie alebo nariedovania s destilovanou apyrogénou vodou alebo s vodným roztokom chloridu sodného o koncentracii maximálne do 30 gramov na liter, s optimom 3,0 až 9,0 gramov na liter, o teplote 0 °C až +6 °C s hodnotou pH v rozmedzí 4,0 až 8,0. Gamaglobulínový roztok sa po oddelení nízkomolekulárnych látok 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 na konečný produkt.

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

Príklady prevedenia

Príklad 1

Východziu surovinou môže byť pasta frakcie II izolovaná metódou podľa Cohna a Oncleya z normálnej alebo hyperimunej savčej plazmy prípadne z normálneho alebo retroplacentárneho prípadne hyperimunej séra savcov s antibakteriálnou, antitoxickou alebo antivírusovou protilátkovou aktivitou. Bielkovinný gamaglobulínový 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 urýchluje miešaním. Po rozpustení sa gamaglobulínový roztok vyčíri napríklad filtráciou.

V technologických pomeroch sú vyššie uvedené podmienky optima zpravidla zachované vtedy ak rozpúšťame 1 kg gamaglobulínovej pasty v 2 000 ml destilovanej apyrogénnej vody o teplote 0 °C až +6 °C. Hodnota pH gamaglobulínového roztoku býva zpravidla v rozmedzí 4,0 až 8,0 a koncentrácia bielkovín v rozmedzí 60 až 100 gramov na liter. Takto pripravený roztok purifikovaného savčieho gamaglobulínu sa vyčíri napríklad filtráciou a nízkomolekulárne zlúčeniny sa zo savčieho gamaglobulínového roztoku odstránia:

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

A. Odstránenie nízkomolekulárnych zlúčenín sa prevádza elučnou gélovou chromatografiou s destilovanou apyrogénnou vodou alebo s roztokom chloridu sodného v destilovanej apyrogénnej vode o koncentrácii do 30 gramov na liter pri teplote 0 °C až +6 °C pri pH 4,0 až 8,0 s vylučovacou medzou gélu vyjadrenou molekulárnou hmotnosťou do 50 000 pričom je potrebné uvedené materiály používať v optimálnom zrení zaručujúcom prietok v technologických podmienkach.

Ko kolóny naplnenej s napučaným gélovým materiálom necháme nasávať gamaglobulínový 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 savčieho gamaglobulínového 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 gamaglobulínového roztoku. Pokiaľ by nedošlo ku dokonalému oddeleniu je potrebné zmenšiť objem vkladaneho gamaglobulínového roztoku na kolónu a spomaliť prietok. Po separácii nízkomolekulárnych zlúčenín zo savčieho zvieracieho gamaglobulínového roztoku sa tento ďalej spracováva.

B. Sterilný roztok purifikovaného gamaglobulínu sa opatrne presaje do sterilného dialyzačného potrubia, ktoré sa pred zahajením presavania v spodnej časti uzatvorí uzlom a po presatí sa vrchná časť uzatvorí uzlom so smyčkou za ktorú sa naplnené potrubie zavesí na háčik, ktorý je tak umiestnený, aby roztok gamaglobulínu v dialyzačnom potrubí bol v stálom styku s pretekajúcou destilovanou apyrogénnou vodou alebo s roztokom chloridu sodného v destilovanej apyrogénnej vode o koncentrácii do 30 gramov na liter 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 separáciu nízkomolekulárnych látok vyjadrenú molekulárnou hmotnosťou do 50 000.

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

C. Odstraňovanie relatívne nízkomolekulárnych zlúčenín do molekulárnej hmotnosti 50 000 je možné uskutočniť pomocou ultrafiltrácie, pričom relatívne nízkomolekulárne látky v podobe roztoku odtiekajú do zbernej nádoby. Ultrafiltráciu je možné realizovať jednak v podobe dutých nití alebo v podobe kazetového systému, kde sa po-

užívajú dosky alebo membrány s definovanými veľkosťami pórov.

Vzhľadom na to, že roztok gamaglobulínu sa pri ultrafiltrácii zakoncentrováva prevedieme opätovné nariadenie s destilovanou apyrogénnou vodou alebo s roztokom chloridu sodného v destilovanej apyrogénnej vode v koncentrácii do 30 gramov na liter a toto zakoncentrovávanie napríklad na polovičný objem a nariadenie na pôvodný objem prevádzame dovtedy pokiaľ je reakcia gamaglobulínového roztoku na prítomnosť chloroformu a etanolu pozitívna.

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 destilovanou vodou.

D. Odstraňovanie relatívne nízkomolekulárnych látok do molekulárnej hmotnosti 50 000 je možné uskutočniť pomocou diafiltrácie pričom relatívne nízkomolekulárne látky prestupujú do roztoku apyrogénnej vody alebo do roztoku chloridu sodného v destilovanej apyrogénnej vode o koncentrácii do 30 gramov na liter pri teplote 0 °C až +6 °C pri pH 4,0 až 8,0, ktoré relatívne nízkomolekulárne látky odplavujú do odpadu. Diafiltráciu je možné realizovať jednak v podobe dutých nití alebo v podobe kazetového systému kde sa používajú dosky alebo membrány s definovanými veľkosťami pórov.

Vzhľadom na to, že roztok gamaglobulínu sa pri diafiltrácii zakoncentrováva, prevedieme opätovné nariadenie s destilovanou apyrogénnou vodou alebo s roztokom chloridu sodného v destilovanej apyrogénnej vode o koncentrácii do 30 gramov na liter a toto zakoncentrovávanie napríklad na polovičný objem a nariadenie na pôvodný objem prevádzame dovtedy, pokiaľ je reakcia gamaglobulínového roztoku na prítomnosť chloroformu a etanolu pozitívna. Savčí gamaglobulínový roztok sa preleje do zbernej nádoby a ďalej sa spracováva.

Sterilizácia diafiltračného zariadenia sa prevádza alebo parou alebo chemickou cestou napríklad prepláchnutím aparatury vodným roztokom formalínu o koncentrácii do 50 gramov na liter a následným 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 aplikáciach podľa Seta a Schultzeho (Seto T., 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 Ruhemana (Ruhemann S.: J. Chem. Soc. 97, 1 438, 1910). Stanovenie

etanolu sa prevádza Agulhonovou reakciou (Agulhon H.: Bull. soc. chim. France[4], 9, 881, 1911) či už v pôvodnom usporiadaní, alebo v novejších aplikáciach podľa Kelletta (Kellett E. G.: Analyst 62, 728 1937), alebo Webba (Webb D. A.: Sci. Proc. Roy Dublin Soc. 21, 281, 1936).

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

Príklad 2

Východziu surovinou môže byť bielko-

vinná pasta alebo bielkovinný roztok savčieho gamaglobulínu izolovaný aj pomocou iných metód. Bielkovinná pasta alebo bielkovinný roztok savčieho zvieracieho gamaglobulínu sa spracováva v ďalšom postupe podobne ako v príklade 1 s tým rozdielom, že kritérium odstránenia nízkomolekulárnych zlúčenín z roztoku gamaglobulínu ne súvisí s prítomnosťou etanolu alebo chloroformu, ale s prítomnosťou precipitačnej látky, ktorá bola na precipitáciu gamaglobulínu alebo jeho imobilizovanie použitá. Kritérium ninhydrín pozitívnych látok je zachované pri akejkoľvek metóde, pričom proces oddelovania sa opakuje dovtedy pokiaľ nieje reakcia v negamaglobulínovom podiele negatívna.

PREDMET VYNÁLEZU

1. Spôsob prípravy krvného zvieracieho savčieho gamaglobulínu pre i. v. podanie vyznačujúci sa tým, že sa bielkovinný materiál obsahujúci purifikovaný savčí gamaglobulín 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 gramov na liter, gamaglobulínový roztok sa vyčirí napríklad filtráciou a oddelia sa nízkomolekulárne látky, vyjadrené molekulovou hmotnosťou do 50 000, potom sa gamaglobulínový roztok sterilizuje napríklad filtráciou a následne sa zakoncentrováva napríklad lyofilizáciou alebo pomocou membrán, vakuovou destiláciou, vymrazovaním a v prípade potreby sa podrobí ďalšiemu spracovaniu na konečný produkt.

2. Spôsob prípravy podľa bodu 1 vyznačujúci sa tým, že oddelenie relatívne nízko-

molekulárnych látok do molekulárnej hmotnosti 50 000 sa prevádza elúciou alebo nariadením s destilovanou vodou alebo roztokom chloridu sodného v destilovanej apyrogénnej vode o koncentrácii do 30 g na liter, pri teplote 0 °C až +6 °C pri pH 4,0 až 8,0.

3. Spôsob prípravy podľa bodu 1 vyznačujúci sa tým, že oddelovanie nízkomolekulárnych látok sa prevedie pomocou gélovej filtrácie, dialýzy, ultrafiltrácie a diafiltrácie.

4. Spôsob prípravy podľa bodu 1 vyznačujúci sa tým, že ako materiál z ktorého sa frakcia obsahujúca gamaglobulín izoluje sa použije savčia zvieracia normálna alebo hyperimunná plazma prípadne normálne, retroplacentárne alebo hyperimunné sérum s definovanou antibakteriálnou, antitoxickou alebo antivírusovou protilátkovou aktivitou.