

(19) Országkód:

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG  
ORSZÁGOS  
TALÁLMÁNYI  
HIVATAL**

# SZABADALMI LEÍRÁS

SZOLGÁLATI TALÁLMÁNY

(11) Lajstromszám:

**200345 A**

(22) Bejelentés napja: 1988.04.05.

(21) (1635/88)

(51) Int Cl<sup>5</sup>

C 07 K 3/24

C 07 K 3/20

(45) Megjelent: 1990.05.28.

(72) Feltalálók:

Zagyerka Sándor, 36%, Bartha Kálmán, 16%,  
dr. Elődi Zsuzsa, 10%, Nagyné, dr. Molnár Zsuzsa, 5%,  
dr. Richter Péter, 8%, dr. Szabados Teréz, 6%,  
Salamon Endréné 8%, Szekeres Erika, 3%, Várszegi Éva, 8%,  
HU Budapest

(73) Szabadalmaz:

Országos Haematológiai és Vértranszfúziós Intézet,  
HU Budapest

**(54) Eljárás immunoglobulin és albumin előállítására 2-etoxi-6,9-diaminoakridin és kromatográfia kombinációjával**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya új eljárás immunoglobulin és albumin előállítására 2-etoxi-6,9-diaminoakridin és kromatográfia kombinációjával. Az eljárás szerint sótanított 4,7 pH értékre állított plazmához keverés közben 2-etoxi-6,9-diaminoakridin szuszpenzióját adagoljuk 7,2—7,8 pH érték, előnyösen pH 7,5 érték eléréséig, további legalább 15 keverés, majd állás után a csapadékról (albumin frakció) a felületűsöt (immunoglobulin frakció) leszivatjuk, majd a kiindulási plazma térfogatával azonos mennyiségű vízzel felhígított csapadék, illetve felülűszo pH értékét 4,0—4,2 pH értékre, előnyösen 4,1 pH értékre állítjuk, majd keverés

közben a kiindulási plazma térfogatára számított 2,2—2,8, előnyösen 2,4 tömeg/térfogat% aktív szenet adagolunk, majd a szenet az elegyből eltávolítjuk a nyert oldatot membrán szűrőn önmagában ismert módon sterilre szűrjük, a kapott 2-etoxi-6,9-diaminoakridinmentes albumin-, illetve immunoglobulin oldatot önmagában ismert kromatográfias tisztítási eljárással tisztítjuk.

A találmány szerinti eljárással a plazmából kinyerhető immunoglobulin mennyisége az ismert adatokhoz képest lényegesen emelkedik.

A leírás terjedelme: 4 oldal, 1 ábra

**HU 200345 A**

A találmány tárgya új eljárás gyógyszerkönyvi előírásnak megfelelő anti-D immunoglobulin, más specifikus immunoglobulin frakciók, valamint albumin előállítására 2-etoxi-6,9-diaminoakridin és kromatográfia kombinációjával.

A plazmafehérjék ipari méretű előállítására még ma is többnyire az ún. hidegalkoholos eljárást alkalmazzák [Cohn és munkatársai: Plasma Protein Fractionation J. Am. Chem. Soc. 68, 459 (1946)]. Ennek az eljárásnak technológiai előnyei mellett azonban számos hátránya is van. Többek között a fehérjék denaturálódásának veszélye, a hűtés nagy energiaigénye és elsősorban az, hogy a hepatitis vírus minden alkoholos eljárással előállított frakcióban kimutatható [Duana D. Schoeder, Milton M. Mozen: Australia Antigen: Distribution during Cohn Etahanol Fractionation of Human Plasma (Cutter lab.) Science, 168, 1462 (1964)].

A kromatográfiai anyagok felfedezése (Prath, J. és Flodin, P. Nature 183, 1959) és gyártása ezeknek mind szélesebb körű alkalmazását tette lehetővé, így az utóbbi években több plazmafrakcionáló eljárást is kidolgoztak [Curling, J.M., Berglöf, J.H., Lindquist, L.O., Erikson, S., Vox Sang. 33, 97-107 (1977); A.D. Friesen, J.M. Bowman, W.C.H. Bees, Nemzetközi Heamatológiai Társaság 19. és Nemzetközi Vártranszfúziós Társaság 17. Kongresszusa, Budapest, 1982.08.01-07., Kongresszusi Közlemény 117-126. oldal], gélszűrők és ioncserélők kombinált alkalmazásával. E módszerekkel sem tudták azonban megoldani a nyert plazmafrakciók hepatitis vírus mentesítését.

Az utóbbi évek során a plazmafrakciók vírusmentesítésére új, az ún. rivanolos eljárást dolgozták ki [H. Geiger, Th. Kranz und Haupt, The Fate of Australia Antigen during Plasma Fractionation 13th International Congress of IABS, Budapest: Part A: Purification of Proteins; Develop. Biol. Standard, 27, 158-165, 166-171 (Karger, Basel 1974); N. Charatte, Hepatitis B: Au/Ha-Antigen during production of Human Albumin and Gammaglobulin, 13th International Congress of IABS, Budapest 1973: Part A: Purification of Proteins]. Ezen eljárások szerint a sómentesített vérplazmából az albumint rivanollal (2-etoxi-6,9-diaminoakridin-laktát) választják le miközben a pH-t nátriumhidroxid-oldattal 7,5—8,0 értékre állítják be. A további tisztítási eljárások előtt azonban a rivanolt úgy az albumin frakcióban, mint a gammaglobulin frakcióban el kell távolítani. Ezt a műveletet a szakirodalmi adatok szerint aktív szénen való adszorpcióval végzik 6,0 pH érték felett (A.R. Neurath, Z. Malik und C. Altner: Immunichemisches Studium eines modifizierten Verfahrens zur Gewinnung von Immunglobulinen Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie mittels Rivanol 121, 240, (1961). Ez a rivanolmentesítésre szolgáló eljárás azonban nagy immunoglobulin veszteséggel jár, a termelés a kiindulási plazmára vonatkoztatva 10—20%. A rivanol nagy részének eltávolítása elvégezhető nátriumkloridos „kisózással” is, de a kisózás után aktív szénes derítést is alkalmaznak, végül a magas nátriumklorid koncentráció (3—10%) miatt még sótalanítást is kell végezni. Az eljárás bonyolultsága miatt üzemi megvalósításra nem alkalmas.

A rivanolmentesítésre ajánlják a kromatográfiai módszert is, üzemi méretekben azonban ez a módszer sem kivitelezhető, mivel a gélhez kötött rivanolt hangyasavval kell lemosni Frantisek Franek: Purification of IgG Monoclonal Antibodies from Ascitic Fluid Based on Rivanol precipitation [Methods in Enzymology, 121, 631, (1986)].

A találmány célja a vérplazma vírusmentesítésére ismert eljárások hátrányainak kiküszöbölése olyan egyszerű nagyüzemi méretekben is megvalósítható eljárással, amely az eddigi eljárásokhoz képest lényegesen magasabb termelést is biztosít a kinyerhető fehérjefrakciókra nézve.

A találmány alapja az a felismerés, hogy a vérplazma albumin frakciójának kicsapásához és egyben a plazma vírusmentesítéséhez rivanol helyett a 2-etoxi-6,9-diaminoakridin vizes szuszpenzióját (elkészítését az 1. példában ismertetjük) adagolva a tejsavval 4,6—4,8 pH értékre beállított plazmához, a pH érték folyamatosan emelkedik, pH 7,5—8,0 érték elérésekor az albumin kicsapódik. Az előzőekben ismertetett, szakirodalomban található eljárások az albumin kicsapódásához a rivanol vizes oldatát alkalmazzák és a pH értéket nátriumhidroxid vizes oldatával állítják be 7,5—8,0 értékre, így a bevitt ionok mennyisége lényegesen több, illetve az ionerősség lényegesen magasabb lesz, mint a mi eljárásunk során, ez atovábbi feldolgozásmenetét befolyásolja és valószínűsíti az alacsony termelési szinteket, melyek a szakirodalomban fellelhetők. A szakirodalomban ugyan fellelhetők olyan adatok, melyek szerint az albumin kicsapásakor 2-etoxi-6,9-diaminoakridin-albumin komplex keletkezik [Sz.E. Tukacsinszkij i V.P. Mojszejeva: Szvjazivnyje rovanola v szivorotocsnimi belkami, Biochimija 26,1 (1961); Mitterhauzerova, K. Králová and L. Krasnec: Interaction of human serum albumin with acridine and phenazin Chem. Zvesti, 32, 124, (1978)], azonban az albumin kicsapásához minden esetben rivanolt alkalmaznak. A kicsapási pH érték beállítása ezekben a leírásokban is nátriumhidroxid vizes oldatával történik.

A szakirodalmi adatok alapján a kicsapott albuminfrakcióból és a kicsapás után kapott immunoglobulinokat tartalmazó frakcióból a rivanolt szénész adszorpcióval távolítják el pH 6,0 vagy ennél magasabb pH értéken. Kísérleteink során azt a meglepő megfigyelést tettük, hogy az aktív szénész adszorpciót 4,1 pH értéken végezve a kiindulási plazmához képest az immunoglobulin termelés jelentősen fokozódik, ugyanis ezen a pH értéken az általunk alkalmazott 2-etoxi-6,9-diaminoakridin nem ad komplexet az immunoglobulinekkal és így nem kötődik fel az aktív szénre. Eredményeinket az 1. ábrában mutatjuk be, ahol az aktív szénész történő adszorbeáltatás után, centrifugáltunk és a felülúszóban az immunoglobulin koncentrációt mértük a szénésznél alkalmazott pH érték függvényében. A fiziológiás pH értéktől való ilyen nagy eltérés nem jelent denaturációs veszélyt, hiszen az aggregáció elkerülésére ma már ilyen pH értéken hoznak forgalomba immunoglobulin készítményeket intravénás célra (R. Tenold és mtsai: Properties and Characteristics of a new immunoglobulin-G intravenous preparation. Reviews of

infectious Dis., 8, Supplement 4., July-August 1986).

A találmány tárgya eljárás immunglobulin és albumin előállítására 2-etoxi-6,9-diaminoakridin és kromatográfia kombinációjával, melynek során anti-D immunglobulint tartalmazó plazma, normál vérplazma, fibrinogén-mentesített plazma, alvadási faktoroktól mentesített plazma sóatlanítását a szakirodalomban megadott módon gélszűréssel [Vox Sang 33, 97-107 (1977)] végezzük, majd az eluátum pH értékét vizes tejsavoldattal 4,6—4,8, előnyösen 4,7 értékre állítjuk és a 2-etoxi-6,9-diaminoakridin steril desztillált vizes szuszpenzióját (készítését az 1. példában írtuk le) adagoljuk, amíg a pH érték a 7,2—7,8, előnyösen 7,5 értéket éri el, ezután még legalább 15 percig, előnyösen 30 percig keverjük a reakcióelegyet, majd előnyösen 20 perc állás után a csapadékról (I. frakció: albumin frakció) a felülúszót leszivatjuk (II. frakció: immunglobulin frakció) pH értékét vizes tejsav oldattal 4,0—4,2, előnyösen 4,1 értékre állítjuk a kiindulási plazma térfogatára számított 2,2—2,9, előnyösen 2,4 súly% aktív szenet adagolunk, Seitz szűrőn, vagy szupercentrifugán a szenet eltávolítjuk, majd membrán-szűrőn, előnyösen 0,2 mm Millipore szűrőn önmagában ismert módon sterilre szűrünk. A szűrletet a továbbiakban a szakirodalomból [Vox Sang 33, 97-107 (1977)] ismeretes ioncserélős tisztítási eljárások bármelyikével tisztítjuk (például 5. példa szerint 5,0%-os, 99% feletti tisztaságú) és liofilizáljuk. Az I.:albumin frakció 2-etoxi-6,9-diaminoakridin-mentesítése megegyezik a II. frakciónál leírt módszerrel, az aktív szenezés után kapott szűrletet a továbbiakban a szakirodalomban ismertetett ioncserélős tisztítási eljárások bármelyikével 20,0%-os, 99% feletti tisztaságú készítménnyé dolgozunk fel (pl. 4. példa szerint).

A találmány szerinti eljárás főbb előnyei a következők:

- a.) alkalmazásával a vírusmentesített vérplazma frakciók a szakirodalmi adatokban megadott 10—20%-os termelése 30—40%-ra emelkedik;
- b.) az eljárás nagyzemileg is kivitelezhető;
- c.) a tisztítás után nyert vérplazma frakciókminősége a gyógyszerkönyvi előírásoknak megfelel.

A találmány szerinti eljárást az alábbi példákban ismertetjük:

#### 1. példa

2-etoxi-6,9-diaminoakridin vizes oldatának elkészítése

80 °C hőmérsékletű steril pirogénmentes desztillált vízben állandó keverés mellett 70 g rivanolt (2-etoxi-6,9-diaminoakridin-laktát) feloldunk, majd steril pirogénmentes desztillált vízzel 1000 milliliterre egészítjük ki a térfogatot, hűtés után állandó keverés mellett 170 milliliter 1 mólos nátriumhidroxidot adagolunk, 30 percig keverjük a reakcióelegyet. A kivált csapadékot szűrjük és steril desztillált vízzel lúgmentesre mossuk. A kivált 2-etoxi-6,9-diaminoakridin csapadékot nedves súlyával azonos térfogatú steril pirogénmentes desztillált vízben szuszpendálva szobahőmérsékleten tároljuk.

#### 2. példa

A plazma sóatlanítása és az I.(albumin)frakció kicsapása

25 liter vérplazmát 4,0 pH-jú, 1,0 milli Siemens vezetőképességű, 0,02 mólos nátriumlaktáttal egyensúlyba hozott Sephadex G-25 Coarse jelű [Pharmacia katalógusszám 17-0034-01(02)] gélszűrővel töltött Sephamatic CF-6 jelű (Pharmacia katalógus szám KS 370) oszlopon sóatlanítunk. A sóatlanítást 12—13 literes ciklusokban végezzük. Az eluált sóatlanított plazmát 100 literes rozsdamentes tartályban gyűjtjük. Az összegyűjtött plazma pH értékét 1 mólos tejsavoldattal állandó keverés mellett pH 4,7 értékre állítjuk és a keverést folytatva 2-etoxi-6,9-diaminoakridin desztillált vizes szuszpenzióját (készítését lásd 1. példában) adagoljuk 7,5 pH érték eléréséig (1300 ml). A 7,5 pH érték elérése után a keverést még 30 percig folytatjuk, majd az elegyet 20 percig állni hagyjuk, majd a kivált csapadékról (I. frakció albumin frakció) a felülúszót (II. frakció immunglobulin frakció) leszívjuk.

#### 3. példa

A 2. példa szerint nyert I. és II. frakció 2-etoxi-6,9-diaminoakridin-mentesítése

A 2. példa szerint nyert a kiindulási plazma térfogatával azonos mennyiségű (25 liter) steril pirogénmentes desztillált vízzel hígított csapadék (I. frakció albumin frakció), illetve a 2. példa szerint nyert felülúszót (II. frakció immunglobulin frakció) pH-ját állandó keverés közben 1 mól tejsavval pH 4,1 értékre állítjuk, majd a keverés tovább folytatva 600 g aktív szenet adagolunk, a szenet mely a 2-etoxi-6,9-diaminoakridint adszorbeálja Seitz szűrőn szűrjük, vagy szupercentrifugán centrifugáljuk, a nyert szűrletet, illetve a felülúszót 0,2 nm Millipore szűrőn engedjük át, majd a kapott 2-etoxi-6,9-diaminoakridin-mentes albumin-, illetve immunglobulin frakciót ismert módon, előnyösen kromatográfias tisztítással megfelelő albumin-, illetve immunglobulin készítményekké dolgozzuk fel (lásd 4. és 5. példa).

#### 4. példa

A 3. példa szerint nyert 2-etoxi-6,9-diaminoakridin-mentes albumin frakció (I. frakció) kromatográfias tisztítása

(30/87 asz. „Eljárás sárgaszínű, stabil humán albumin oldat előállítására emberi vérplazmából” c. magyar szabadalmi bejelentésünk szerint)

A 3. példa szerint nyert 2-etoxi-6,9-diaminoakridin-mentes albumin oldathoz (I. frakció) állandó keverés mellett 1 mól nátriumkaprilátot adagolunk 5,2 pH érték eléréséig. Az elegyet 30 percig kevertjük, majd szupercentrifugáljuk, a kapott felülúszót 0,2 nm Millipore szűrőn szűrjük, majd a szűrletet vezetőképességét desztillált víz adagolásával 1,6 milli Siemens értékre, pH-ját 1 mól nátriumhidroxiddal 5,2 értékre állítjuk és 5,2 pH-jú 1,6 milli Siemens vezetőképességű 0,02 mólos nátriumacetát pufferral egyensúlyba hozott DEAR Sepharose FF jelű (Pharmacia készítmény) anioncserélő gyantaoszlopra (16 liter) visszük fel. Az eluciót három lépésben a következő pufferekkel végezzük: 1) 0,02

mólos 5,2 pH-jú 1,5 milli Siemens vezetőképességű nátriumacetát: 20 liter, 2) 200 liter 0,025 mólos 4,5 pH-jú 2,0 milli Siemens vezetőképességű nátriumacetát, 3) 150 liter 0,125 mólos 4,8 pH-jú 8,8 milli Siemens vezetőképességű nátriumacetát. A 2. pufferrel történő eluáláskor albumin frakciót nyerünk. Az albumin frakciót ezt követően 0,025 mólos 4,5 pH-jú 1,8 milli Siemens vezetőképességű nátriumacetát puufferrel egyensúlyba hozott 16 liter CM-Sepharose FF jelű (Pharmacia készítmény) kationcserélő gyanta oszlopra visszük fel, három lépésben eluálunk a következő pufferekkel: 1/172 liter 0,025 mólos 4,5 pH-jú 1,8 milli Siemens vezetőképességű nátriumacetát, 2/175 liter 0,11 mólos 5,5 pH-jú 6,0 milli Siemens vezetőképességű nátriumacetát, 3) 75 liter 0,4 mólos 8,2 pH-jú 23 milli Siemens vezetőképességű nátriumacetát. A 2. pufferral kapott eluátum tartalmazza az albumin frakciót. Ennek pH-ját 1 mólos nátriumhidroxid vizes oldatával 6,5 pH értékre állítjuk, majd 0,05 mólos nátriumklorid oldattal egyensúlyba hozott Sephacryl S-200 jelű (Pharmacia készítmény) gélszűrőre visszük a gélről 0,3 mólos 7,0 pH-jú 4 milli Siemens vezetőképességű acetátpufferral eluálunk és az albumin frakciót 20% összfehérje tartalom eléréséig ultraszűrővel besűrítjük, majd a nátrium-ion tartalmat szilárd nátriumklorid adagolásával 130 millimól/liter értékre a Ph-t 1 mólos sósav, vagy 1 mólos nátriumhidroxid vizes oldatával 7,0 értékre állítjuk be és stabilizáló szerként nátriumkaprilát oldatot adagolunk 0,04 mól/liter nátriumkaprilát végkoncentráció eléréséig, végül az oldatot sterilre szűrjük és palackozzuk, a palackozott albumin oldatot 10 órán át 60 °C hőmérsékleten pasztőrizzuk. Halványsárga színű, 20% összfehérje tartalmú, 99% feletti tisztaságú albuminkészítményt kapunk, mely vírust nem tartalmaz. A készítmény stabil, állás után sem tapasztalható csapadék kiválás.

#### 5. példa

**A 3. példa szerint nyert 2-etoxi-6,9-diaminoakridin-mentes immunglobulin frakció (II. frakció) kromatográfiás tisztítása**

A 3. példa szerint nyert 2-etoxi-6,9-diaminoakridinmentes immunglobulin oldathoz (II. frakció) KS 370 típusú (Pharmacia gyártmányú) készülékbe helyezett 0,02 mólos, 5,6 pH-jú, 1,4 milli Siemens vezetőképességű nátriumacetát pufferrel egyensúlyozott DEARG jelű (Pharmacia készítmény, összetétel: DEAE Sepharose Fast Flow: 60% Arginin Sepharose 4B: 40%) anioncserélő gyantán (16 liter) engedünk át és az átfolyó oldatot CM-Sepharose FF jelű (Pharmacia gyártmányú) 0,02 mólos, 5,6 pH-jú, 1,4 milli Siemens vezetőképességű nátriumacetát pufferrel egyensúlyozott KS 370 típusú készülékbe helyezett kationcserélő gyantára (16 liter) visszük fel. Az oszlopot 20 liter 0,02 mólos nátriumacetáttal, majd 30 liter 0,01 mólos glycinnel mosuk, majd az immunglobulint 0,15 mól glycint és 0,1 mól nátriumhidroxidot tartalmazó 9,0 pH-jú puffer oldattal eluáljuk. Az eluált immunglobulin frakció pH-ját 1 mólos vizes sósav oldattal 7,0 értékre állítjuk, majd ultraszűrővel 5,0% fehérje tartalomra koncentrálnak ezt követően szűrővel sterilizálunk. A nyert immunglobulin oldatot -25 °C hőmérsékleten tároljuk ampullázásig. Az immunglobulin készítmény liofilizálva a Ph.Hg. VII előírásainak megfelelő.

lyozott DEARG jelű (Pharmacia készítmény, összetétel: DEAE Sepharose Fast Flow: 60% Arginin Sepharose 4B: 40%) anioncserélő gyantán (16 liter) engedünk át és az átfolyó oldatot CM-Sepharose FF jelű (Pharmacia gyártmányú) 0,02 mólos, 5,6 pH-jú, 1,4 milli Siemens vezetőképességű nátriumacetát pufferrel egyensúlyozott KS 370 típusú készülékbe helyezett kationcserélő gyantára (16 liter) visszük fel. Az oszlopot 20 liter 0,02 mólos nátriumacetáttal, majd 30 liter 0,01 mólos glycinnel mosuk, majd az immunglobulint 0,15 mól glycint és 0,1 mól nátriumhidroxidot tartalmazó 9,0 pH-jú puffer oldattal eluáljuk. Az eluált immunglobulin frakció pH-ját 1 mólos vizes sósav oldattal 7,0 értékre állítjuk, majd ultraszűrővel 5,0% fehérje tartalomra koncentrálnak ezt követően szűrővel sterilizálunk. A nyert immunglobulin oldatot -25 °C hőmérsékleten tároljuk ampullázásig. Az immunglobulin készítmény liofilizálva a Ph.Hg. VII előírásainak megfelelő.

#### Szabadalmi igénypont

25 Eljárás immunglobulin és albumin előállítására 2-etoxi-6,9-diaminoakridin és kromatográfia kombinációjával vérplazmából a plazma ismert módszerrel gélszűrőn történő sómentesítésével, *azzal jellemezve*, hogy a sótalánított plazma pH értékét vizes tejsav oldattal állandó keverés mellett 4,6—4,8 pH értékre, előnyösen 4,7 pH értékre állítjuk be és keverés közben az elegyhez 2-etoxi-6,9-diaminoakridin szuszpenzióját adagoljuk 7,2—7,8 pH érték, előnyösen 7,5 pH érték eléréséig, az elegyet legalább 15 percig előnyösen 30 percig keverjük, majd 20 perc állás után a csapadékról a felülzót leszivatjuk, majd a kiindulási plazma térfogatával azonos mennyiségű vízzel felhígított csapadék, illetve a felülzót pH értékét 4,0—4,2 pH értékre, előnyösen 4,1 pH értékre állítjuk be vizes tejsav oldattal, majd keverés közben a kiindulási plazma térfogatra számított 2,2—2,8, előnyösen 2,4 tömeg/térfogat% aktív szenet adagolunk, majd a szenet az elegyből eltávolítjuk, a nyert oldatot membrán szűrőn önmagában ismert módon sterilre szűrjük, a kapott 2-etoxi-6,9-diaminoakridinmentes albumin-, illetve immunglobulin oldatot önmagában ismert kromatográfiás tisztítási eljárással tisztítjuk.

50

1. ÁBRA

IMMUNGLOBULIN

ug/ml

