



FEDERÁLNY ÚRAD
PRE VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

269 556

(21) PV 7804-87.G
(22) Prihlásené 30 10 87

(40) Zverejnené 12 09 89
(45) Vydané 29 01 91

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
C 07 K 15/14
C 07 K 3/28

(75) Autor vynálezu MIKULA IVAN doc. MVDr. CSc., PREŠOV
ROSOCHA JÁN prof. MVDr. CSc., KOŠICE
BULÍK JOZEF ing. CSc., PREŠOV

(54)

Spôsob izolácie albumínu

(57) Riešenie možno použiť v imunologickej výrobe liečebných prípravkov z krvnej plazmy alebo séra. Účelom riešenia je zavedenie do výroby nového spôsobu stabilizácie zvieracieho albumínu, pri ktorej je zachovaná nativita bielkoviny, dosahovaná dobrá výťažnosť za využitia ingrediencií domácej výroby (stabilizátor - glukóza), čím sa zefektívni výroba albumínu. Uvedený izolačný postup predstavuje iba jeden operačný stupeň a môže byť vykonaný pri izbovej teplote. Vyššia efektívnosť technologického postupu sa dosahuje tým, že krvná plazma, resp. sérum sa stabilizuje glukózou, pH sa upraví na hodnotu 6,0 až 6,1 a pridá sa 96% etanol v množstve 12 až 18 objemových percent. Nasledujúcim zahriatím roztoku pri 45 až 55 °C a úpravou hodnoty pH na 5,0 až 5,1 vzniklý precipitát sa odstráni a supernatant predstavuje albumín minimálne o 95% elektroforetickej čistote.

Vynález sa týka spôsobu izolácie albumínu, a to tým, že k východnej plazme, resp. séru sa pridá glukóza a etanol a pri vhodnom pH sa plazmatické bielkoviny mimo albumínu deštruujú teplom.

Doposiaľ najvýznamnejšie izolačné postupy albumínu sú:

a/ Frakcionácia etanolom (Cohn, E.J. et. al.: Preparation and properties of serum and plasma proteins IV a system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. J.Am.Chem.Soc. 68, 459, 1946; Nitschman H., Kistler, P., Lergie, W.: Vereinfachter Verfahren zur Gewinnung von humanen Albumin und gamaglobulin aus Blutplasma. Helv.Chem.Acta, 37, 866, 1954 ; Hořejší, J. : O bílkovinách krevní plazmy. Čas.lék.českých 39, 1065, 1953).

b/ Rivanolová metóda (Hořejší, J., Smetana, R.: O vlivu rivanolu na plazmatické bílkoviny, Chem.listy 48, 758, 1954; Škvařil, F.: Příspěvek ke studiu účinku rivanolu na plazmatické bílkoviny. Čsl.farmacia, 9, 522, 1957 ; Salfer, A., Lipkin, L.E.: Electrophoretic and immunological studies of rivanol fractionated serum proteins. Proc.Soc. Exp.Biol.Med. 102, 1, 220-222, 1959).

c/ Separácia bielkovín pomocou tvorby reverzibilných komplexov s kovmi (Surgenor, D.M., Humes, N.J., Brown, R.K.: Blood Cells and Plasma Protein (ed. Tullis, J.L.), Academic Press, New York, 1953).

d/ Tepelno - denaturačné metódy (Mikula, I. a kol.: Čísťková záverečná správa VII-4-7/02 - Využitie krve z odporazených zvierat pre výrobu prípravku na báze albumínu, 1987 ; AO 258203 "Spôsob izolácie zvieracieho albumínu ; Hoch, H., Chanusin: Arch.Biochem., Biophys. 51, 27, 1954; Lundblad, J.: Vox Sang. 5, 122, 1971; Schneider, W. et al.: Folia hematol. 104, 116, 1977).

Nevýhodou týchto postupov je skutočnosť, že k stabilizácii albumínu sa používajú ťažko dostupné zahraničné stabilizátory, ktorých cena negatívne ovplyvňuje ekonomický efekt výroby a energeticky drahé a technicky náročné zariadenia.

Vynález rieši izoláciu albumínu z plazmy alebo séra tým spôsobom, že albumín je stabilizovaný glukózou, čím je chránený v priebehu deštrukcie ostatných plazmatických bielkovín.

Podstatou izolácie albumínu z plazmy alebo séra spočíva v tom, že ku krvnej plazme resp. séru sa pridá 0,2 až 0,3 M glukózy. Po dôkladnej homogenizácii sa hodnota pH upraví 1 M kyselinou octovou na hodnotu 6,0 - 6,1. Za stálého miešania sa po kvapkách pridáva 96 % etanol do koncentrácie 12 - 18 objemových percent. Potom sa roztok za stálého miešania zahrieva pri teplote 45 - 55 °C po dobu 10 minút. Na to pH zmesi sa upraví na hodnotu 5,0 - 5,1 a schladí na teplotu +18 °C - +20 °C. Vzniklý precipitát sa odstredí a supernatant sa filtruje a lyofilizuje.

Príklad č. 1

K 1000 ml krvnej plazmy alebo séra sa pridáva 49,5 g glukózy ako stabilizátoru a pH sa upraví 1M kyselinou octovou na pH 6,0. K zmesi za stálého miešania sa pridáva 96% etanol v množstve 189 ml a roztok je zahrievaný pri teplote 45 °C po dobu 10 minút. Potom pH roztoku je upravené 1M kyselinou octovou na hodnotu 5,1 a následne roztok je schladený na teplotu 18 °C. Vzniklý precipitát je separovaný na centrifúge. Supernatant je filtrovaný a lyofilizovaný. Hmotnosť lyofilizovaného produktu 20,1 g, elektroforetická čistota 95,7.

Príklad č. 2

K 2000 ml krvnej plazmy alebo séra sa pridáva 80 g glukózy ako stabilizátoru a pH sa upraví 1M kyselinou octovou na 6,1. K zmesi za stálého miešania sa pridáva 96 % etanol v množstve 253 ml a roztok je zahrievaný pri teplote 55 °C po dobu 10 minút. Potom pH roztoku sa upraví 1 M kyselinou octovou na hodnotu 5,1 a následne roztok je ochladený na teplotu 20 °C. Vzniklý precipitát je separovaný na centrifúge. Supernatant je filtrovaný a lyofilizovaný. Hmotnosť lyofilizovaného produktu 38 g, elektroforetická čistota 96,2.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob izolácie albumínu, vyznačujúci sa tým, že k plazme alebo séru sa pridá glukóza tak, že jej koncentrácia činí 0,2 až 0,3 M, pH sa upraví na hodnotu 6,0 až 6,1, pridáva sa 96% etanol do 12 až 18 % objemových, roztok sa zahrieva na teplotu 45 až 55 °C po dobu 10 minút, potom sa upraví pH na hodnotu 5,0 až 5,1, ochladí sa na teplotu +18 až +20 °C, vzniklý precipitát sa odstredí a supernatant sa filtruje a lyofilizuje.