

URZĄD PATENTOWY

Urząd Patentowy
Polski

C/2d 13/06

RZECZYPOSPOLITEJ POLSKIEJ

OPIS PATENTOWY

Nr 1923.

Kl. 30 h 6.

Elektro - Osmose, Aktiengesellschaft
(Graf Schwerin Gesellschaft)
(Berlin, Niemcy).

Sposób przenoszenia tak zwanych materij uodporniających ze swoistego ciała białkowego na nieswoiste albo zaopatrzone w inne materje uodporniające białko.

Zgłoszono 19 sierpnia 1920 r.

Udzielono 21 kwietnia 1925 r.

Pierwszeństwo: 11 lipca 1918 r. (Niemcy).

W tak zwanych surowicach uodporniających, to znaczy w surowicach ze zwierząt, uodpornionych toksynami albo kulturami bakteryjnymi, a zatem wogóle tak zwanymi antygenami, albo wywołującymi albo w krwi indywiduów, które przez przejście infekcji zdobyły uodpornienie, są, jak pokazuje praktyka, ciała uodporniające związane z białkiem; ciała te rozdzielają się na zawarte w krwi ciała białkowe nierównomiernie i należy rozróżniać pomiędzy swoistem i nieswoistem białkiem. W antitoksynowych, a częściowo i w zabijających bakterje surowicach, a zatem, np. w surowicy dyfterytu i drętwy, jak również w surowicy przeciw-streptokokowej i pneumokokowej ma się do czynienia z całkowicie nie-

swoistem białkiem czerwonych i białych ciałek krwi, włóknikiem i albuminami. Jako swoiste należy uważać wyłącznie krążki (globuliny), ale i w tej grupie ciał białkowych są nierównomiernie podzielone specyficzne własności, a istnieje stopniowa różnica w działaniu nierozpuszczalnej albo euglobuliny i rozpuszczalnej albo para-względnie pseudoglobuliny, polegająca na tem, że te ostatnie należy uważać jako główne nośniki właściwych sił surowicy uodporniającej, gdy działanie euglobuliny jest stosunkowo mniejsze.

Obecnie znaleziono, że ten podział specyficznego oddziaływania polega na rozmaitem powinowactwie albo sile przyciągającej, którą posiadają ciała białkowe w

stosunku do właściwych ciał uodporniających. Ustalono, że włóknik i albuminy nie mają żadnego powinowactwa do specyficznych ciał uodporniających, euglobulina-mała, a najsilniejsze powinowactwo do tych ciał ma para - albo pseudoglobulina.

20/01/01
Rozpoznanie powyższego zostało ustalone dzięki temu, że udaje się odciągnąć od euglobuliny związane z niemi ciała uodporniające roztworami paraglobuliny, przez co niewłaściwym paraglobulinom nadaje się specyficzne własności, albo paraglobulinę o mniejszym specyficznym działaniu można zamienić na silniej działające białko. Tą samą drogą udaje się utrzymywać związki rozmaitych ciał uodporniających na jednym ciele białkowym.

Następnie znaleziono, że przenoszenie specyficznego działania z jednego ciała białkowego na drugie udaje się nie tylko przy użyciu ciał białkowych jednego i tego samego gatunku zwierząt, ale również i wtedy, gdy euglobulina pochodzi z krwi jednego gatunku zwierząt, np. z surowicy końskiej, natomiast paraglobulina może być otrzymana z krwi dowolnego rodzaju, np. krwi ludzkiej.

Sposób polega na tem, że euglobulinę przeprowadza się, najlepiej na drodze elektroosmotycznej, w nierozpuszczalną formę i izolowaną w ten sposób euglobuliną działa się na również elektroosmotycznie otrzymaną paraglobulinę, przyczem obojętnem jest, czy dana paraglobulina posiada specyficzne własności tego samego, czy innego charakteru.

Euglobuliny posiadają własność łatwego i zupełnego rozpuszczania się w wodnych roztworach paraglobuliny w obecności najmniejszych ilości soli obojętnych. Przy rozpuszczeniu euglobuliny, zawierającej specyficzne uodporniające materje, np. strąconej z surowicy dyfterytowej na drodze elektroosmotycznej w roztworze paraglobuliny przy jednoczesnem dodaniu małych ilości soli kuchennej ma miejsce na-

tychmiastowe przejście specyficznych materij uodporniających z euglobuliny na paraglobulinę i po usunięciu euglobuliny roztwór paraglobuliny posiada te specyficzne własności, które poprzednio posiadała euglobulina, z roztworu, np. euglobulin z surowicy dyfterytowej w paraglobulinie z normalnej krwi końskiej, krowiej albo ludzkiej po wydzieleniu euglobuliny otrzymuje się roztwór paraglobuliny, zawierający antitoksyny.

Sposób polega przeto poszczególnie na wydzieleniu euglobuliny ze specyficznych surowic uodporniających, następnie z wytworzenia paraglobuliny z normalnych albo specyficznych uodporniających surowic i po trzecie z ekstrahowania specyficznych uodporniających materij z euglobuliny przez roztwór paraglobuliny, która ze swej strony może pochodzić z normalnej albo specyficznej surowicy uodporniającej.

Ponieważ sposób wyrabiania rozmaitych surowic i oddzielne kombinowania ich posiadają cały szereg wspólnych punktów, to przed podaniem określonych przykładów będą omówione metody, powtarzające się w ten sam sposób przy obrabianiu rozmaitych normalnych i specyficznych surowic.

1. Wytworzenie euglobuliny.

Do wytwarzania euglobuliny używa się surowica z krwi albo wolna od włóknika plazma. Do wydzielenia euglobuliny z tych płynów posługiwano się dotychczas strącaniem kwasem octowym albo kwasem węglowym po poprzednim silnem rozwodnieniu surowicy z krwi albo plazmy wodą albo po dializie aż do usunięcia soli. Sposoby te zawierały jednak znaczne wady. Strącanie kwasami nie jest ilościowe, gdyż produkt strącania, a mianowicie euglobulina jest rozpuszczalna w małym nadmiarze kwasu; dla osiągnięcia najlepszych wyników strącania trzeba często surowicę, albo plazmę, rozcieńczać bardzo znacznymi ilościami wody, z powodu czego powstaje ta

niewygodą, że pracuje się dużemi objętościami. Z drugiej strony, dializę dla zupełnego uwolnienia od soli trzeba przeprowadzać w przeciągu wielu tygodni; wymaga ona dużych ilości ciepła i przedstawia niebezpieczeństwo zanieczyszczenia zawierających białko płynów bakterjami, łatwo wywołującymi gnienie.

W przeciwieństwie do powyższego przy opisywanym sposobie oddzielania euglobuliny z surowicy z krwi albo plazmy stosuje się stale elektroosmozę, która, w porównaniu z dotychczasowymi metodami przedstawia tę wygodę, że strącanie euglobuliny ma przebieg bezwzględnie ilościowy, że zbytecznem jest powiększanie objętości płynu przez rozcieńczenie wodą, że proces jest ukończony w przeciągu 1—2 godzin, i, w rezultacie, jest zupełnie wykluczone wszelkie niebezpieczeństwo zanieczyszczenia bakterjami, a wraz z tem i niebezpieczeństwo uszkodzenia specyficznych substancji uodporniających.

Surowica albo plazma zostaje wprowadzona w środkową przestrzeń składającego się z trzech części przyrządu, który — podług rysunku, składa się z czworokątnej skrzyni *a*, której wewnątrz dwiema półprzepuszczalnymi przeponami *b* i *c* jest podzielone na trzy komory. Bezpośrednio pod przeponami są napięte siatki *d* i *e* z drutu platynowego, które doprowadzają prąd do znajdującego się pomiędzy obydwoma przeponami płynu (surowica albo plazma). Napięcie i siła prądu zależy w tym wypadku od zawartości elektrolitu surowicy, więc, na początku procesu otrzymuje się prąd o stosunkowo małym napięciu i dużej sile, w końcu — prąd o wysokim napięciu i bardzo małej sile. Z początku procesu napięcie wynosi około 20 V i siła prądu — około 15 A. Napięcie i siła prądu przechodzą następnie wszystkie fazy, aż do napięcia 500 V i siły prądu 0,1 — 0,2 A. Czas trwania działania prądu elektrycznego aż do zupełnego uwolnienia od

elektrolitu wynosi przeciętnie 2 godziny. Z początku jest reakcja w przestrzeni środkowej przyrządu bardzo słabo alkaliczna, po krótkim czasie — obojętną, przejściowo staje się silniej alkaliczną i wreszcie — kwaśną. Przy występowaniu kwaśnej reakcji rozpoczyna się wypadanie euglobuliny, które osiąga maximum w momencie zupełnego uwolnienia od soli. Również i produkt końcowy posiada bardzo słabą kwaśną reakcję, która, jak wiadomo, jest właściwą czystym ciałom białkowym. Po ukończeniu procesu zostaje środkowa przestrzeń przyrządu opróżniona, euglobuliny zostają zebrane zapomocą filtrowania albo zapomocą wirówki i gruntownie wymyte niezawierającą soli wodą. Wymywanie ma na celu całkowite usunięcie przylegającego rozpuszczalnego białka

Przy użyciu specyficznej surowicy występuje rozdział specyficznych ciał uodporniających na strąconą euglobulinę i na pozostałe w roztworze białko w ten sposób, że mniej więcej piąta część specyficznych ciał uodporniających przypada na euglobulinę, a pozostałość — na rozpuszczalne białko. Uszkodzenie specyficznych ciał uodporniających prądem elektrycznym nigdy niema miejsca przy obrabianiu surowicy w składającym się z trzech części przyrządzie, co zostało udowodnione wieloma przykładami.

Surowica dyfterytowa zawiera, np. w 1 cm³, około 250 jednostek antytoksynowych przy zawartości około 10,0% białka. W litrze surowicy było przeto 250000 jednostek antytoksynowych, a zatem na 1 g białka przypada dokładnie 2500 jednostek antytoksynowych. Elektroosmotycznym sposobem otrzymano z jednego litra tej surowicy:

30 g pozostałości (euglobuliny) z 1800 jednostek antytoksynowych w jednym g
54000 jednostek antytoksynowych
960 cm³ płynu (70 g rozpuszcz. białka)
z 280 jednostek antytoksynowych w 1 cm³

196000 jednostek antytoksynowych razem 250000 jednostek antytoksynowych.

Z powyższego wynika, że nie wystąpiło żadne uszkodzenie antytoksyny przez metodę elektroosmotyczną.

Przy dalszej obróbce euglobulina stosuje się w stanie wilgotnym w postaci pasty.

2. Wytwarzanie paraglobuliny.

Do otrzymywania paraglobuliny z surowicy albo plazmy usuwa się przedewszystkiem na drodze elektroosmotycznej w sposób, podany w przykładzie 1, euglobulinę, łączy się centryfugat z wodą do mycia i obrabia mieszaninę w wiadomy sposób przez przejściowe strącanie solą. Naprzykład, zadaje się mieszaninę tych centryfugatów, filtratów i wody do wymywania równą objętością nasyconego roztworu siarczanu amonowego i zbiera wydzielającą się przytem paraglobulinę przez filtrowanie albo zapomocą wirówki. Po gruntownym wymyciu półnasyconym roztworem siarczanu amonowego rozpuszcza się osad ten w wodzie i poddaje roztwór aż do osiągnięcia uwolnienia od soli działaniu dializy w węzłach pergaminowych, przyczem otrzymuje się prawie wolny od soli, przeważnie słabo żółty roztwór, który zostaje wyparowany do suchości w przestrzeni o rozrzedzonym powietrzu przy niskiej temperaturze; produkt jest trwały i łatwo rozpuszczalny w wodzie.

3. Ekstrakcja specyficznych uodporniających substancyj z euglobuliny przez roztwór paraglobuliny.

Okazało się najwygodniejszym używaniem do ekstrakcji specyficznej euglobuliny 5%-go roztworu paraglobuliny. Euglobulina jest rozpuszczalna w roztworze paraglobuliny; dla podniesienia tej rozpuszczalności i jednocześnie dla nadania roztworowi potrzebnej zdolności elektrycznego przewodnictwa dodaje się do roztworu paraglobuliny 0,4 — 0,5% soli kuchennej. W roztwór ten wprowadza się wilgotną

pastę euglobuliny w takiej ilości, żeby płyn zawierał jednakową ilość paraglobuliny i euglobuliny, razem około 10%. Mieszaninę pozostawia się w niskiej temperaturze, najlepiej w chłodnicy pokojowej w przeciągu 24 godzin, następnie wprowadza w środkową przestrzeń trójkomorową przyrządu i poddaje działaniu prądu elektrycznego, w tych samych warunkach, jakie opisane są przy wytwarzaniu euglobuliny z surowicy; również reakcja przebiega wszystkie fazy od alkalicznej do kwaśnej i przy uwolnieniu od soli następuje całkowite wydzielenie euglobuliny, którą się usuwa z płynu przez filtrowanie albo zapomocą wirówki, przez co otrzymuje się wolny od soli roztwór paraglobuliny, wyróżniającą się od początkowej tylko tem, że posiada te specyficzne cechy, które poprzednio właściwymi były dla euglobuliny. Analiza wagowa nie daje możności rozpoznania, uwarunkowanego powyższym, powiększenia ciężaru.

Zapomocą reakcji specyficzną antysurowicą można się przekonać, że wytworzony na tej drodze roztwór paraglobuliny nie zawiera różnorodnego białka.

Dalsze szczegóły metody zostaną najlepiej wyjaśnione z następujących przykładów.

Przykłady. 1. Przenoszenie antytoksyny z surowicy końskiej na białko ludzkie zostaje wykonane w następujący sposób: antytoksyna albo surowica zawiera w 100 częściach: 9,8 g suchej substancji, 8,9 g organicznej substancji, 0,9 nieorganicznej substancji i 8,8 białka, a mianowicie: 2,3 g euglobuliny, 4,5 paraglobuliny i 2,0 g albuminy.

1 cm³ antytoksyny albo surowicy zawiera 250 dyfterytowych jednostek antytoksyny.

Z 2 litrów tej surowicy wytwarza się euglobulinę. Do zastosowania ma się 176 g białka z 50000 jednostek antytoksy-

nowych. Otrzymuje się wkońcu wilgotną pastę z 46 g suchej substancji (euglobuliny) i 92000 jednostek antytoksynowych.

Surowica z ludzkiej krwi zawiera w 100 częściach: 9,4 suchej substancji, 8,4 organicznej substancji, 1,0 g nieorganicznej substancji i 8,4 g białka, a mianowicie: 2,2 g euglobuliny, 2,0 g paraglobuliny i 4,2 g albuminy. W surowicy nie można było wykazać śladów antytoksyny dyfterykowej.

Z jednego litra surowicy została przedewszystkiem podług powyżej wskazanego sposobu usunięta na drodze elektroosmotycznej euglobulina. Wydzielona euglobulina zostaje dobrze wymyta, wodę z mycia wraz z filtratem, względnie centryfugatem dołącza się do otrzymanej na drodze elektroosmotycznej euglobuliny i postępuje się w celu usunięcia albuminy podług opisanej pod 2 metody. Otrzymuje się zupełnie klarowny płyn, który, po wyparowaniu w próżni przy niskiej temperaturze, daje 20 g najczystszej, prawie wolnej od soli, paraglobuliny.

Ponieważ wytworzenie ludzkiej surowicy, którą można otrzymać z puszczania krwi z żył albo z krwi przy operacjach w szpitalach, jest połączone często z trudnościami, to do wytwarzania paraglobuliny można okazynie stosować płyn brzuszny, który ma ten sam jakościowy skład, co surowica z krwi ludzkiej i który może być otrzymany łatwo w dowolnej ilości ze szpitali i zawiera w 100 częściach: 6,6 suchej substancji, 1,2 nieorganicznej substancji, 5,4 organicznej substancji i 5,2 białka, a mianowicie: 1,2 euglobuliny, 1,5 paraglobuliny i 2,5 albuminy. Z 2 litrów tego płynu otrzymano 30g najczystszej paraglobuliny.

Ekstrakcja dyfterykowej antytoksyny z euglobuliny: roztworem paraglobuliny wykonywa się w następujący sposób: 50 g paraglobuliny rozpuszcza się w 1000 cm³ wody z dodatkiem 5g soli kuchennej. Do roztworu tego wprowadza się w postaci

pasty izolowana z surowicy z krwi końskiej euglobulina, zawierająca 46g suchej substancji i 92000 jednostek antytoksynowych, przyczem następuje rozpuszczenie. Mieszanina z ludzkiej paraglobuliny i euglobuliny z surowicy z krwi końskiej zostaje pozostawiona w przeciągu 24 godzin w niskiej temperaturze (chłodnicy pokojowej), a następnie przeprowadzona do środkowej przestrzeni trójkomorowego przyrządu i poddana działaniu prądu elektrycznego. Po nowem wydzieleniu euglobuliny otrzymuje się klarowny płyn, składający się z najczystszej ludzkiej paraglobuliny, której zawartość wynosi znów 50g suchych części.

Przy określeniu antytoksyny znaleziono, że jeden gram tej ludzkiej paraglobuliny zawierał 1000 jednostek antytoksynowych, a zatem 50g — 50000 jednostek; z antytoksynowej euglobuliny z surowicy końskiej o 92000 jednostkach antytoksynowych przeniesioną została około połowy antytoksyny na ludzkie białko.

Przy dalszej próbie do tego samego roztworu ludzkiej paraglobuliny wprowadzono dalszą ilość 50 g z dyfterykowej surowicy końskiej otrzymanej euglobuliny, której zawartość antytoksyny wynosiła 100000 jednostek. Po nowem elektroosmotycznym wydzieleniu tej euglobuliny otrzymano roztwór ludzkiej paraglobuliny, zawierającej 50 g suchej substancji z 100000 jednostek antytoksynowych. Roztwór ten w przestrzeni o rozrzedzonym powietrzu przy niskiej temperaturze zostaje o tyle zgęszczony, że otrzymany w ten sposób roztwór w 100 częściach zawiera 10 g ludzkiego białka i 1 cm³ tego roztworu zawierał 200 jednostek antytoksynowych, i, w ten sposób, przedstawiał surowicę, w której zawartość antytoksyny była wystarczającą dla stosowania do celów zapobiegawczych i terapeutycznych.

2. Z dwóch litrów surowicy antystreptokokowej z 9,7% suchej substancji, skła-

dającej się z 8,9% białka i 0,8% ciał nieorganicznych, została również wydzielona euglobulina na drodze elektroosmotycznej. Otrzymaną została wilgotna pasta, której zawartość suchej substancji wynosiła 60 g. Biologiczne badanie wykazało, że w tej euglobulinie zawarte było 25% ciał uodporniających, które mogły być wykazane w pierwotnej surowicy antystreptokokowej.

Niezależnie od tego, z dwóch litrów surowicy pneumokokowej zostały wytworzone dwa litry roztworu paraglobuliny, zawierającej 48 g suchej substancji. Do roztworu tego wprowadzono 30 g euglobuliny z surowicy antystreptokokowej i jednocześnie rozpuszczono 10 g w soli kuchennej. Po ponownym wydzieleniu euglobuliny na drodze elektroosmotycznej otrzymany roztwór białka okazał się działającym zarówno na streptokoki, jak i na pneumokoki. Po stężeniu w rozrzedzonym powietrzu przy niskiej temperaturze surowica ta może być stosowaną do zwalczania infekcji streptokokowej i pneumokokowej. W ten sam sposób zostają wytworzone z antytoksynowych surowic mieszanki surowiczne, jak, np. Serum Antidiphthericum-antitetanicum albo mieszanki z własnościami antytoksynowymi i zabójczymi dla bakterij. Przenoszenie specyficznie działających substancji leczniczych albo zabezpieczających uodporniających surowic z ciał białkowych, z którymi one były luźno związane na inne ciała białkowe, było znane tylko w ten sposób, że pierwsze z tych ciał białkowych wraz z zabezpieczającymi specyficznymi materjami strąca się albo wydziela, odfiltrowuje, a następnie traktuje surowicą, przyczem materia zabezpieczająca przechodzi na ciała białkowe surowicy. Znany sposób, używany do wydzielania, względnie przenoszenia specyficznych ciał uodporniających na surowicę z krwi, względnie taką plazmę, polegał na tem, że całkowite białko strącano alkoholem i kwasem octowym i wydzielone w ten

sposób białko ekstrahowano surowicą, zawierającą te same specyficzne materje, przeprowadzenie jednak tego sposobu przedstawia o tyle trudności, że dla każdej surowicy z krwi potrzebny jest zupełnie określony stosunek surowicy, alkoholu i kwasu octowego. Dalej wydajność, nawet po ustaleniu tego stosunku nigdy nie jest ilościowa, gdyż w filtracie pozostają jeszcze ciała białkowe, a razem z tym specyficzne materje uodporniające. Również i ekstrakcja dużych objętości osadów jest bardzo utrudniona, gdyż powstają ciągliwe masy, dające się trudno oddzielić przez filtrowanie i filtrowanie albo centryfugowanie jest połączone ze znacznymi stratami, a przy tem osiągane w ten sposób techniczne działanie jest stosunkowo nieznaczne, gdyż największa część antytoksyny nie zostaje ekstrahowaną z surowicy, a pozostaje wraz z nierozpuszczalnym białkiem i ta pozostała część nie może być stosowana dla celów terapeutycznych.

W przeciwieństwie do powyższego, jest stosowane przy nowym sposobie elektroosmotycznym oddzielenie euglobuliny z surowicy z krwi nadzwyczaj wygodne i całkowicie ilościowe. Ponieważ euglobulina jest rozpuszczalna w roztworach paraglobuliny w obecności soli, to przenoszenie uodporniających ciał z euglobuliny na paraglobulinę zachodzi o wiele łatwiej i w większych ilościach, jak przy starym sposobie, a ponieważ oddzielenie uwolnionej od antytoksyn euglobuliny z roztworu paraglobuliny osiągane bywa znów na drodze elektroosmotycznej, to daje się przeprowadzić bez trudności i bez straty. Dzięki zaś temu, że euglobulina w nieobecności soli jest nierozpuszczalna, w ostatecznym produkcie po drugiej osmozie niema zupełnie w filtratach i centryfugatach początkowo użytego do ekstrakcji białka, co ma wielkie znaczenie przy przenoszeniu specyficznych ciał uodporniających z białka jednego rodzaju zwierząt na inny rodzaj.

Zastrzeżenia patentowe.

1. Sposób przenoszenia tak zwanych uodporniających materyj ze swoistego ciała białkowego na nieswoiste albo zaopatrzone w inaczej ukształtowane materyje uodporniające, znamienny tem, że z surowicy uodporniającej wydziela się euglobulinę na drodze elektroosmotycznej, rozpuszcza ją w surowicy z krwi albo lepiej w roztworze paraglobuliny z surowicy z krwi normalnych albo uodpornionych indywiduów i z mieszaniny tej powtórnie wydziela się

euglobulinę na drodze elektroosmotycznej.

2. Sposób według zastrz. 1, znamienny zastosowaniem rozmaitych surowic uodporniających do wytwarzania takich surowic, które są jednocześnie wyposażone w obojętne, antytoksynowe i zabójcze dla bakteryj własności.

Elektro-Osmose, Aktiengesellschaft (Graf Schwerin Gesellschaft).

Zastępca: M. Brokman,
rzecznik patentowy.

