



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

248241
(11) (B1)

(22) Prihlášené 16 08 85
(21) (PV 5958-85)

(40) Zverejnené 12 06 86

(45) Vydané 15 07 88

(51) Int. Cl.⁴
C 07 K 3/24
//A 61 K 35/16

(75)

Autor vynálezu

BULÍK JOZEF ing. CSc., BAŇDA IMRICH ing. CSc.,
STACHÝ ALFRÉD MUDr. CSc., PREŠOV

(54) Spôsob izolácie ľudských plazmatických bielkovín obsahujúcich albumín

1

2

Riešenie možno použiť v imunologicko-biologickej výrobe pri frakcionácii ľudskej plazmy na izoláciu stabilizovaných plazmatických bielkovín obsahujúcich albumín.

Účelom riešenia je podstatné skrátenie technologického postupu, zvýšenie technologickej úrovne, výťažnosti a príprava výrobkov o lepších kvalitatívnych parametroch ako doposiaľ. Skrátením výrobného cyklu vytvorí sa rezervy pre rozšírenie výroby a zvýšenie výrobnnej kapacity bez nároku na ďalšie investície.

Zvýšenie účinku sa dosahuje cielenejšou frakcionáciou, vďaka vhodnej kombinácii organických činidiel, peroxidu vodíka, etanolu a kyseliny kaprylovej pri hodnote pH 6,0 až 6,1 a teplote +15 °C až +30 °C na dokonalejšiu izoláciu lipoproteínov a labilných globulínov pri pH 5,0 až 5,1.

Vynález sa týka spôsobu izolácie plazmatických bielkovín obsahujúcich albumín z ľudskej plazmy, pri ktorom sa uplatňuje kombinovaný účinok peroxidu vodíka, etanolu a kyseliny kaprylovej pri precipitácii balastných bielkovín, osobitne lipoproteínov.

V súčasnom období stabilné plazmatické bielkoviny obsahujúce albumín, ktoré sa vyrábajú pod komerčným názvom „Stabilizovaný roztok plazmatických bielkovín“ sa vo väčšine prípadov izolujú etanolovou frakcionáciou vo forme frakcie IV + V, z ktorej sa potom extrahujú labilné bielkoviny z oblasti beta a alfa globulínov. Oddelenie týchto bielkovín sa prevádza za podmienok, ktoré nie sú optimálne a preto nezaručujú ich kvantitatívnu precipitáciu a z toho dôvodu negatívne ovplyvňujú stabilitu konečného výrobku.

Z najznámejších postupov izolácie plazmatických bielkovín obsahujúcich albumín možno spomenúť (Rybák M., Škvařil F., Andrašina J.: *čs. Farmácia* 3, 137, 1963; Milár A. a spol.: Stabilný plazmatický roztok bielkovín — záverečná správa 1965; Jusko B., Bulík J.: AO č. 182 921; Kyselev A. E., From A. A., Nikitenko A. A., Rusanov V. M.: *Problemi gematologii i perelivania krovi* 4, 9, 1967; Rusanov V. M.: *Problemi gematologii i perelivania krovi* 1, 51, 1968).

Nevýhodou spomínaných technologických postupov je časová náročnosť, pričom kvalita konečného výrobku nie je štandardná, pretože v priebehu uskladňovania hotových výrobkov sporadicky dochádza k zníženiu kvality následkom zvýšenia turbidity.

Podstata nového spôsobu izolácie ľudských plazmatických bielkovín obsahujúcich prevažne albumín spočíva v tom, že k supernatantu obsahujúceho 19 % objemových etanolu, získaného z ľudskej plazmy, po oddelení fibrinogénu a imunoglobulínov sa pH upraví na hodnotu 6,0 až 6,1 a pridá sa 0,2 až 0,4 % objemových vodného roztoku peroxidu vodíka a 0,3 až 0,4 % objemových koncentrovanej kyseliny kaprylovej na pôvodný objem supernatantu.

Po vytemperovaní roztoku na teplotu +15 až +30 °C po dobu 1 až 10 minút sa hodnota pH zníži na 5,0 až 5,1 a schladí na teplotu +15 °C. Potom sa roztok mieša 1 hodinu a precipituje po dobu 1 až 12 hodín. Vyzrážané balastné bielkoviny sa od roztoku obsahujúceho stabilné plazmatické bielkoviny, prevažne albumín, oddeľujú filtráciou alebo centrifugáciou. Takto pripravený bielkovinový roztok sa rozplňuje, namrazuje, lyofilizuje a farmaceuticky spracúvava bežným technologickým postupom.

Prednosti uvedenej technológie sú v tom, že kombináciou peroxidu vodíka, etanolu a

kyseliny kaprylovej sa dosahuje dokonalejší frakčionačný efekt pri precipitácii balastných bielkovín obsahujúcich vysoké % lipoproteínov. Silný delipitačný účinok peroxidu vodíka na lipoproteíny popisuje (From a spol.: patent ZSSR č. 332 831; Samojlenko a spol.: *ŽMEI* 12, 30, 1983). Dobrý precipitačný účinok plazmatických bielkovín z oblasti globulínov zvyšuje kyselina kaprylová (Hoch H., Chanutin A.: *Arch. of Biochem. and biophysic* 51, 271, 1954).

Príklad 1

10 000 ml supernatantu obsahujúceho 19 percent objemových etanolu získaného z ľudskej plazmy po oddelení fibrinogénu a imunoglobulínov sa vytemperuje na 0 °C a pH sa upraví 0,5M NaOH na hodnotu 6,0 až 6,1. Potom sa k roztoku pridá 200 ml 5 percentného peroxidu vodíka a 40 ml kyseliny kaprylovej a teplota roztoku sa zvýši na +20 °C na dobu 1 minúty. Po úprave pH 1M kyselinou octovou na hodnotu 5,0 až 5,1 sa roztok schladí na teplotu +15 °C. Roztok sa ďalej nechá miešať 1 hodinu a potom precipitovať balastné bielkoviny po dobu 4 hodín.

Vyprecipitované balastné bielkoviny sa separujú centrifugáciou, supernatant sa filtruje cez čeriacie vložky, podrobí sa ultrafiltrácii alebo dialýze, po ukončení ktorej sa rozplňuje, namrazuje a lyofilizuje. Lyofilizovaný polotovar sa spracúvava na injekčný roztok známymi technologickými operáciami.

Príklad 2

10 000 ml supernatantu obsahujúceho 19 percent objemových etanolu získaného z ľudskej plazmy po oddelení fibrinogénu a imunoglobulínov sa vytemperuje na 0 °C a pH sa upraví na hodnotu 6,0 až 6,1 0,5M NaOH. Potom sa k roztoku pridá 100 ml 5 %-ného peroxidu vodíka a 35 ml kyseliny kaprylovej a teplota roztoku sa zvýši na +25 °C na dobu 5 minút. Po úprave pH 1M kyselinou octovou na hodnotu 5,0 až 5,1 sa roztok schladí na teplotu +15 °C. Roztok sa ďalej nechá miešať 1 hodinu a potom precipitovať balastné bielkoviny po dobu 4 hodín.

Vyprecipitované balastné bielkoviny sa separujú centrifugáciou, supernatant sa filtruje cez čeriacie vložky, podrobí sa ultrafiltrácii alebo dialýze, po ukončení ktorej sa rozplňuje, namrazuje a lyofilizuje. Lyofilizovaný polotovar sa spracúvava na injekčný roztok známymi technologickými operáciami.

Hodnotenie kvality výrobku

Požadované skúšky	Požiadavka PNY	Výsledky výrobku podľa PV
sterilita	vyhovuje	vyhovuje
apyrogenita	vyhovuje	vyhovuje
tepelná stabilita	90 n. j.	26,9 n. j.
elektrof. čistota	min. 90 %	96,4 %

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob izolácie ľudských plazmatických bielkovín obsahujúcich albumín zo supernatantu získaného z ľudskej plazmy po oddelení fibrinogénu a imunoglobulínov vyznačujúci sa tým, že pH supernatantu obsahujúceho 12 až 20 % objemových etanolu pri teplote +15 až +30 °C sa upraví na hodnotu 6,0 až 6,1, pridá sa 0,2 až 4 % objemových 5 %-ného vodného roztoku pero-

xidu vodíka a 0,3 až 0,4 % objemových koncentrovanej kyseliny kaprylovej, pričom % sa vzťahuje k východzieho objemu supernatantu, pH sa upraví na hodnotu 5,0 až 5,1 a pri teplote +15 °C sa vyzrážajú baltné bielkoviny, ktoré sa oddelia filtráciou od roztoku obsahujúceho stabilné ľudské plazmatické bielkoviny obsahujúce prevažne albumín.