



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU 259178

## K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(61)

(23) Výstavní priorita  
(22) Přihlášeno 04 07 86  
(21) PV 5084-86.H

(11) B<sub>1</sub>

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>

C 07 K 15/06,  
C 07 K 15/14,  
A 61 K 37/04

(40) Zveřejněno 15 02 88  
(45) Vydáno 31.03.89

(75)  
Autor vynálezu

ŠOUREK JIŘÍ RNDr. PhMr. CSc.,  
ZELENKOVÁ LUDMILA RNDr. PhMr. CSc., PRAHA

(54)

Způsob přípravy gama-globulinu

Řešení se týká způsobu přípravy gama-globulinu z nové výchozí suroviny, tj. z odtučněné a dekaseinované kolostrální formy mateřského mléka savců, imunizovaných před porodem bakteriálními imunogeny, z nichž jeden je společný mikroorganismům čeledi Enterobacteriaceae, tedy z tzv. mleziva, a to tak, že se z výchozí suroviny nejprve vysráží síranem amonným frakce surového gama-globulinu, ta se po odsolení a odstranění balastů, které nemají charakter protilátek, znovu frakcionuje síranem amonným, potom se frakce purifikovaného gama-globulinu odsolí a získaný roztok se lyofilizuje. Takto připravený gama-globulin slouží k protinfekční ochraně novorozenečích mláďat hospodářských zvířat v prvních dnech jejich života.

Vynález se týká způsobu přípravy gama-globulinu, a to z nové dosud nepopsané výchozí suroviny, tj. z odtučněné a dekaseinované kolostrální formy - mleziva - mateřského mléka savců, imunizovaných před porodem bakteriálními imunogeny, z nichž jeden je společný mikroorganismům čeledi Enterobacteriaceae.

Jak je známo, získávají se globuliny, tedy i gama globulin, specifická, v klinické praxi užívaná léčiva, z krevního séra, což je surovina, zejména v případě lidského séra, drahá a omezeně přístupná.

Je známo, že v mateřském mléce savců, zejména v jeho kolostrální formě, tzv. mlezivu, je daleko vyšší obsah protilátek než v séru /přibližně 16krát vyšší/, což znamená, že mateřské mléko, resp. jeho kolostrální forma, tedy představuje vydatný zdroj všech druhů protilátek, hlavně proti střevním chorobám, jenž může u novorozenech mláďat hospodářských zvířat hrát významnou roli účinné protiinfekční ochrany v prvních hodinách a dnech života. Především u novorozenech telat, a to v prvních pěti dnech jejich života, kdy mohou být ztráty značně vysoké.

Gama-globulin, připravený z odtučněné a dekaseinované kolostrální formy mateřského mléka savců, jejíž protilátková aktivita je navíc posílena imunizací vhodnými vakcinami, například bakteriálními imunogeny, z nichž jeden je společný mikroorganismům čeledi Enterobacteriaceae, aplikovanými v době březosti, může podstatně ovlivnit přežití novorozenech mláďat se sníženou schopností sání, nebo jinak oslabených. Podávání dostatečných dávek gama-globulinu /popřípadě dalších imunoglobulinů/, připraveného z kolostrální formy mateřského mléka a upraveného do vhodné aplikační formy, může zabránit velkým národohospodářským ztrátám.

Mléko savců, zejména v době porodu a po porodu, kdy přechází v mlezivo, se stává účinným obranným protiinfekčním mechanismem, který mohou matky, kromě vlastního přenosu protilátek placentární cestou, poskytnout navíc nové generaci.

Ovšem mléko savců, zejména jeho kolostrální forma, obsahuje značné množství tuku a kaseinu, jež je zapotřebí v co největší míře odstranit. Při izolaci gama-globulinu je však nutno dbát především toho, aby se při odstraňování balastních látek ne-snižoval jeho obsah a aby nenastala degradace a tím i celkový pokles biologického účinku.

Protože až dosud nebyl znám způsob přípravy gama-globulinu z kolostrální formy mléka savců, účelně imunizovaných před porodem, bylo nutno takový způsob vyvinout, samozřejmě s přihlédnutím ke specifické povaze výchozí suroviny. Bylo nutno také zvolit vyhovující podmínky, které by umožnily co nejrychlejší izolaci gama-globulinu a jeho purifikaci do ekonomicky únosného stupně čistoty, při zachování biologické aktivity a minimálním snížení jeho původního obsahu. Způsob přípravy gama-globulinu podle vynálezu se podstatně liší od běžného způsobu přípravy z krevního séra savců.

Vynález se tedy týká způsobu přípravy gama-globulinu z odtučněné a dekaseinované kolostrální formy - mleziva - mateřského mléka savců, imunizovaných před porodem bakteriálními imunogeny, z nichž jeden je společný mikroorganismům čeledi Enterobacteriaceae, jehož podstata spočívá v tom, že se z výchozí suroviny při hodnotě pH 6,5 až 7,5 vyloučí přidávkem nasyceného vodného roztoku síranu amonného ve formě sraženiny frakce surového gama-globulinu, která se po rozpuštění ve vodě dialýzuje proti vodě při teplotě nejvýše 10 °C, ze získaného roztoku se fyzikálně, například filtrací s aktivním uhlím nebo odstředěním a/nebo chemicky, zejména působením vyšší kvartérní amoniové soli, například dimethylaurylbenzylamoniumbromidu, odstraní balasty, potom se při hodnotě pH 6,5 až 7,5 přidávkem nasyceného vodného roztoku síranu amonného vyloučí purifikovaný gama-globulin, který se po rozpuštění ve vodě dialýzuje proti vodě při teplotě nejvýše 10 °C a nakonec se získaný roztok zbaví vody, například lyofilizací.

Způsobem podle vynálezu lze získat za technologicky přijatelných podmínek významné léčivo z dostupné a levné výchozí suroviny, ve vyhovující čistotě a dobrých výtěžcích.

Bližší podrobnosti způsobu podle vynálezu vyplývají z následujícího příkladu provedení, který samozřejmě není omezen

pouze na podmínky v něm uvedené, nýbrž dovoluje i různé obměny, pokud je lze zahrnout do požadovaného rozsahu ochrany.

Kravské mléko, získané ihned po porodu /tzv. první nádoj/, se odstřeďuje na chlazené centrifuze při 3000 ot/min po dobu 30 min. Oddělená vrstva tuku se kvantitativně odstraní. Potom se odtučněné mléko okyselí kyselinou chlorovodíkovou na pH 4,2 až 4,5 a nechá se stát při teplotě místnosti přes noc. Druhý den se mléko odstředí v chlazené centrifuze při 3000 ot/min po dobu 40 min, sediment /kasein/ se odstraní a supernatant se dále zpracovává.

800 ml supernatantu se upraví 0,1 N hydroxidem sodným na pH 7,0, přidá se stejný objem nasyceného vodného roztoku síranu amonného /74,5 g síranu na 100 ml destilované vody/ a míchá se 60 min při teplotě místnosti. Potom se nechá ustát v lednici přes noc a odstředěním za chlazení /3000 ot/min/ po dobu 30 min se izoluje sediment; supernatant se odstraní. Sediment surového gama-globulinu se rozpustí v malém množství destilované vody a proti ní se dialyzuje při 4 °C tak dlouho, až výsledek zkoušky dialyzátu v dialyzační trubici na přítomnost amonných a síranových iontů je negativní. Dialýza trvá přibližně 5 až 7 dní, při dvou až třech výměnách destilované vody a za občasného promísení obsahu dialyzačních trubíc v průběhu dne.

Tekutina z dialýzy se zalkalizuje 0,1 N hydroxidem sodným na pH 8,0 a přidá se 10% vodný roztok dimethylaurylbenzylamoniumbromidu /nebo obdobné kvartérní amoniové soli/ v množství 45 ml na 1 litr dialyzátu /potřebné množství kvartérní amoniové soli se stanoví předem elektroforetickým testem/. Směs se zahřeje na vodní lázni na 40 °C, po dosažení této teploty se ihned z lázně odstraní a nechá stát při teplotě místnosti do druhého dne. Druhý den se případně vyloučený sediment balastních látek odstředí za chlazení /3000 ot/min po dobu 30 min/ a supernatant se okyselí 0,1 N kyselinou chlorovodíkovou na pH 5,0 až 5,5 /optimum 5,3/. Do takto upraveného supernatantu se přidá 5 % hmot. práškového aktivního uhlí. Po důkladném promíchání se nechá stát přes noc při teplotě místnosti a druhý den se uhlí odstraní jednak odstředěním /3000 ot/min po dobu 30 min/ jednak filtrací supernatantu přes Seitzův filtr. Fil-

trát se upraví 0,1 N hydroxidem sodným na pH 7,0. Neutrální roztok se vysráží stejným objemem nasyceného vodného roztoku síranu amonného, který se přidává po kapkách, za stálého míchání. Míchá se 60 min při teplotě místnosti a potom se směs uloží přes noc do lednice. Druhý den se směs za chlazení odstřeďuje při 3000 ot/min po dobu 30 min. Po odstranění supernatantu se sediment, tj. purifikovaný gama-globulin, rozpustí v malém objemu destilované vody a dialyzuje se za podmínek uvedených výše. Po posledním odstředění se supernatant lyofilizuje. Výtěžek gama-globulinu z 800 ml výchozího upraveného mléka je 11,2 g, jeho elektroforetická čistota je 97 %.

Takto izolovaný gama-globulin tvoří bílý nehygroskopický prášek, který lze uchovávat v uzavřené nádobě při teplotě místnosti. Lyofilizát je dobře rozpustný ve vodě a používá se v roztoku, nejlépe do koncentrace 16 % hmot. Sterilitu roztoku lze zajistit za podmínek běžných pro obdobný preparát připravený ze séra.

#### P R Ě D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob přípravy gama-globulinu z odtučněné a dekaseinované kolostrální formy - mleziva - mateřského mléka savců, imunizovaných před porodem bakteriálními imunogeny, z nichž jeden je společný mikroorganismům čeledi Enterobacteriaceae, vyznačující se tím, že se z výchozí suroviny při hodnotě pH 6,5 až 7,5 vyloučí přidávkem nasyceného vodného roztoku síranu amonného ve formě sraženiny frakce surového gama-globulinu, která se po rozpuštění ve vodě dialyzuje proti vodě při teplotě nejvýše 10 °C, ze získaného roztoku se fyzikálně, například filtrací s aktivním uhlím nebo odstředěním a/nebo chemicky, zejména působením vyšší kvartérní amoniové soli, například dimethylaurylbenzylamoniumbromidu, odstraní balasty, potom se při hodnotě pH 6,5 až 7,5 přidávkem nasyceného vodného roztoku síranu amonného vyloučí purifikovaný gama-globulin, který se po rozpuštění ve vodě dialyzuje proti vodě při teplotě nejvýše 10 °C a nakonec se získaný roztok zbaví vody, například lyofilizací.