



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

209458

(11) (B2)

[51] Int. Cl.³
A 61 K 37/26

(22) Přihlášeno 28 04 72

(21) (PV 2923-72)

(32) (31) (33) Právo přednosti od 30 04 71
(139120) Spojené státy americké

(40) Zveřejněno 31 10 80

(45) Vydáno 15 05 84

(72) (73)
Autor vynálezu
a současně
majitel patentu

JACKSON RICHARD LEE, INDIANAPOLIS (Sp. st. a.)

(54) Způsob výroby komplexu inzulínové soli s protaminem

1

Vynález se týká způsobu výroby komplexu inzulínové soli s protaminem.

Předmětem vynálezu je tedy způsob výroby komplexu inzulínové soli s protaminem, vyznačující se tím, že se při pH 6,5 až 8,0 uvede v reakci ve vodném prostředí protaminu a zinku a těžkých kovů prostá sůl inzulínu s alkalickým kovem nebo amonná sůl inzulínu tak, že na každých 100 jednotek inzulínu se přidá 0,2 až 1,5 mg protaminu, za vzniku suspenze ve vodě nerozpustného komplexu.

Současné inzulínové preparáty se obvykle rozdělují na krátkodobé, středně dlouhé nebo s prodlouženým účinkem s ohledem na jejich biologickou účinnost. U mnoha případů cukrovky je žádaným preparátem k terapeutickému užití takový, jež má rychlý nástup účinku a prodloužené trvání působení. Takové dvojité působení k účinnému potlačení hyperglykemie, používající jediné injekce, nevykazuje dosud žádná z obchodně dosažitelných inzulínových směsí.

Přestože v posledních letech předem smíšené inzulínové přípravky, mající žádané krátkodobé a středně dlouhodobé hypoglykemické působení, byly zavedeny na trh, vyžadují tyto preparáty stále ještě speciální skladování a konzervaci a vyžadují zlep-

2

šení. Předem smíšené preparáty se skládají z roztoku krystalického zink-inzulínu získaného z prasečích pankreatů a krystalického hovězího inzulínu s vysokým obsahem zinku. Ostatní dřívější preparáty, ve kterých se smísí roztoky krystalického zink-inzulínu nebo amorfního inzulínu s preparáty protamin-zink-inzulínu, narážely na problémy stability vyvolané rozkladem protaminu a rovněž precipitací rozpustné inzulínové vložky přebytkem protaminu ve směsi. Mnoho problémů jako je nízká čistota, nedostatečná stabilita barva, znečištění hyperglykemickým hormonem (glukagonem) a antigenními proteiny s velkou molekulární vahou, brzdily vývoj přípravku majícího jak rychlý nástup, tak dlouhotrvající hypoglykemické působení.

Jednou z předností tohoto vynálezu je, že umožňuje jednotlivou injekci inzulínové suspenze, která po aplikaci vede jak k rychlému nástupu účinku, tak k jeho prodlouženému trvání. Další předností je, že inzulínový komplex nebo suspenze mohou být skladovány po dlouhou dobu bez podstatného rozkladu.

Na obr. 1, 2, 3, 4 a 5 jsou grafy, kde jsou vyneseny hladiny krevního cukru dosažené injekcemi řady různých inzulínových preparátů u zvířat.

Obr. 1 obsahuje graf srovnávací účinek injekce preparátu natrium-protamin-inzulínového a isophanininzulínového (NPH). Na ose úseček je uveden čas v hodinách, na ose pořadnic hladina cukru v krvi v mg %.

Obr. 2 jde o graf srovnávací účinek komplexu nebo suspenze připravené podle tohoto vynálezu s účinkem směsi kyselého obyčejného inzulínu a isophan-inzulínu. Na ose úseček je uveden čas v hodinách, na ose pořadnic hladinu cukru v krvi v mg %. Křivka 1 znázorňuje průběh hladiny cukru v případě směsi běžného inzulínu a isophan-inzulínu, křivka 2 v případě komplexu podle vynálezu.

Obr. 3 jde o graf srovnávací tři suspenze připravené podle vynálezu a to, hovězího inzulínu, vepřového inzulínu a jejich směsi. Na ose úseček je uveden čas v hodinách, na ose pořadnic hladina cukru v krvi v mg %. Křivka 1 znázorňuje vliv vepřového inzulínu, křivka 2 vliv směsi vepřového a hovězího inzulínu (75 % : 25 %) a křivka 3 vliv hovězího inzulínu.

Obr. 4 jde o graf porovnávací účinnost komplexu podle vynálezu po skladování. Na ose úseček je uveden čas v hodinách, na ose pořadnic hladina cukru v krvi v mg %. Na křivce 1 je účinek při použití ihned po výrobě při 25 °C, na křivce 2 účinek po 1 týdnu při 25 °C, křivce 3 účinek po 4 týdnech při 25 °C. Je zřejmé, že účinnost je v podstatě stálá.

Obr. 5 obsahuje graf srovnávací příklady komplexů a suspenzí připravených podle vynálezu. Na ose úseček je uveden čas v hodinách, na ose pořadnic hladina cukru v krvi v mg %. Na křivce 1 je účinek amonné soli, na křivce 2 lithné soli na křivce 3 draselné soli a na křivce 4 sodné soli. Je zřejmé, že sodná sůl je nejvýhodnější.

Obr. 6 obsahuje graf, získaný podáním komplexu podle vynálezu (křivka 1) a směsi natriumprotamininzulínu s isophan-inzulínem NPH (křivka 2) čtyřem osobám na lačno (od půlnoci do 17 hodin). Bylo podáno vždy 0,25 jednotek/kg. Na ose úseček je uveden čas v hodinách, na ose pořadnic hladina cukru v krvi v mg %. Je zřejmé, že účinek komplexu podle vynálezu je podstatně příznivější.

Komplex inzulínové soli s protaminem utvořený způsobem podle vynálezu je užitečný jako aktivní složka v hypoglykemické směsi mající jak rychlý nástup, tak prolongovaný účinek. Inzulínová sůl je buď solí alkalického kovu, nebo solí amonnou a protamin se s výhodou užívá jako sulfát v poměru na každých 100 jednotek inzulínu od 0,2 do 1,5 mg, s výhodou od 0,4 do 0,8 mg.

Inzulínová sůl, která je v podstatě zbavena zinku nebo jiného těžkého kovu se s výhodou připraví krystalizací inzulínu v alkalickém prostředí s užitím hydroxidu sodného, hydridu alkalického kovu nebo hydroxidu amonného. Po krystalizaci se krystaly promyjí a usuší na vlhký zbytek nepřesahující 10 % obsahu vody.

Inzulínová sůl je rychle rozpustná ve vodě za neutrálního pH a může být v roztoku skladována po dobu tří měsíců bez podstatných změn.

V souhlasu se způsobem podle vynálezu se svrchu popsaná inzulínová sůl a protamin smísí ve vodném prostředí, a tak vytvoří komplex inzulínové soli a protaminu. Vodné prostředí má pH kolem 6,5 do 8,0. Komplex protaminu a inzulínové soli může být snadno oddělen filtrací nebo podobnými způsoby od tekutého prostředí a usušen. Komplex může být v suché formě skladován nejméně po dobu jednoho roku i déle bez poškození. Je-li třeba použít komplex protaminu a inzulínové soli, suchý materiál se rekonstituuje ve vodném prostředí, s výhodou se užívá jako rozpouštědla izotonických roztoků o pH 6,5 až 8,0. Po rekonstituci je komplex připraven k injekci. Pacient, jemuž byl rekonstituovaný preparát aplikován, pocítí jak rychlý nástup, tak prodloužené trvání hypoglykemické aktivity.

Typická metoda k přípravě komplexu protaminu s inzulínovou solí zahrnuje přípravu sodné soli inzulínu takovým způsobem, že natrium inzulín je prakticky bezzinkový, to znamená, že obsahuje méně než 0,05 % zinku. Sodná sůl je krystalická, ale je rozpustná ve vodě a v izotonických rozpouštědlech. Po přípravě se sodná sůl rozpustí v tekutém prostředí a to v poměru 90 až 115 jednotek na 100 ml tekutého média. Do tekutého média se přidá přiměřené množství protaminsulfátu. Ihned se vytvoří nerozpustný komplex ve formě velmi jemného precipitátu. Precipitát rozptýlený na jemné částičky zůstává dobře suspendován v tekutém médiu a dovoluje uživateli snadnou injekční aplikaci. Je-li komplex skladován v tekutém médiu, zůstává stálý a nevykazuje žádnou ztrátu účinnosti po dobu nejméně jednoho roku. Jestliže se sušený komplex protaminu a inzulínové soli rekonstituje, je žádoucí míchat komplexem v tekutém prostředí, aby se precipitát rovnoměrně v tekutině distribuoval k injekčnímu použití.

Přesná povaha asociace mezi inzulínovou solí a protaminem není známa, avšak asociace je dostatečně pevná, takže nerozpustný komplex je snadno separovatelný z tekutého prostředí a dá se vysušit, což usnadňuje zacházení při distribuci přípravku a umožňuje dlouhodobé skladování. Výrobek v suché formě může být skladován bez časového omezení.

Nejprve se mělo za to, že rychlý nástup účinku pozorovaný s preparáty komplexu protaminu s inzulínovou solí je způsoben volným inzulínem v mateřském tekutém médiu, avšak analýza ukázala, že jenom 0,015 % celkové inzulínové aktivity přípravku zůstává v rozpustné formě.

Z toho plyne, že spojení inzulínu s protaminem není příliš pevné, a tak inzulín může být brzy po injekci schopen absorpce.

Také je možné, že povaha tohoto komplexu je odlišná od známých komerčních preparátů protamin-zink-inzulínových, u nichž je disociace inzulínu z komplexu ve tkáních mnohem pomalejší a kde nedochází k žádnému rychlému nástupu v působení.

Komplex inzulínové soli s protaminem se tvoří v kapalném prostředí o pH 6,5 až 8,0, s výhodou 7,2 až 7,6.

Sůl inzulínu s alkalickým kovem se získá tak, že se uvede surový inzulín ve styk s ionty alkalického kovu, čímž dojde ke krystalizaci inzulínu ve formě soli s alkalickým kovem. Z ekonomických důvodů a pro snadné provedení tohoto postupu je jako zdroj iontu alkalického kovu nejvýhodnější hydroxid sodný. Sodná sůl se připraví tak, že se vodný roztok surového inzulínu uvede ve styk s hydroxidem sodným v množství, které je dostatečné k zajištění pH 8,0 až 8,5. Postup se provádí za míchání alkalického roztoku alespoň 15 minut, s výhodou hodinu nebo delší dobu. Sodná sůl inzulínu se vysráží a lze ji snadno izolovat odstředěním, filtrací, slitím apod. Produkt může být čištěn rozpuštěním a opětovným vysrážením tak dlouho, až se získá sraženina, podobná krystalkům. Analýzou bylo prokázáno, že v případě sodné soli inzulínu, sůl obsahuje 1 mol sodíku na 1 mol inzulínu. Krystaly sodné soli inzulínu mohou být vyrobeny z inzulínu hovězího nebo vepřového, jsou velmi rozpustné ve vodě a v izotonických roztocích při neutrálním pH.

Vhodnými alkalickými kovy nebo kovy alkalických zemin, kterých lze užít k přípravě inzulínových solí, jsou zejména draslík, lithium, cesium, sodík a amonný iont.

Protamin se obvykle užije ve formě síranu nebo jakékoli jiné vhodné, ve vodě rozpustné formě.

V případě, že se jako kapalného prostředí pro síran protaminu a inzulínovou sůl užije izotonický roztok běžného typu, je výhodné, aby obsahoval ještě konzervační prostředek, například fenol, nebo methylparahydroxybenzoát.

Biologická účinnost komplexu inzulínu s protaminem byla stanovena na králících následujícím způsobem: 36 králíků bylo rozděleno na dvě stejně veliké skupiny a 24 hodin před pokusem jim nebyla podávána potrava, v průběhu testu nedostávala zvířata potravu ani vodu. Vzorek krve byl odebrán z ušní žíly a ve vzorku byla stanovena počáteční koncentrace krevního cukru. Kontrolní skupině králíků byl podán neutrální Hagedornův protamininzulín (NPH) v předem stanovené dávce. Zkušební skupina dostala komplex sodné soli inzulínu s protaminem (PSI). Jednotlivá dávka byla 1,0 jednotky pro králíka, tato dávka byla podána v objemu přibližně 0,01 ml. První vzorky krve byly u každého králíka odebrány po 1/2 hodině, další vzorky za 1,5 hodin, 3,0 hodin, 5,0, 7,0 a 9,0 hodin po injekci. Každý vzorek krve byl zkoumán na hladinu krevního cukru, výsledky byly vyjádřeny v mg % glukózy. Pro obě skupiny byla potom vypočítána průměrná hladina krevního cukru při každém odběru.

Po týdnu byl pokus opakován se stejnými skupinami králíků až na to, že obě skupiny byly zaměněny, to znamená, že původní kontrolní skupina nyní obdržela komplex sodné soli inzulínu s protaminem a obráceně. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrná hladina krevního cukru v mg % na obr. 1 a v tabulce 1.

Tabulka 1

Hladina krevního cukru mg %

Čas v hodinách	0	0,5	1,5	3,0	5,0	7,0	9,0
kontrola (NPH)	83,8	64,9	43,3	41,3	64,6	67,4	69,8
PSI	80,1	51,1	36,9	36,1	51,1	60,6	70,9

Je zřejmé, že komplex sodné soli inzulínu s protaminem zajistí rychlejší nástup účinku a delší trvání účinku než přípravek, který byl užít pro srovnání.

PSI (sodná sůl inzulínu s protaminem) byla srovnávána se směsí ARI (běžný inzulín kyselé povahy) a NPH v poměru 1 : 1.

Koncentrace protaminsulfátu byla 0,8 mg na ml.

Při tomto testu bylo užito 36 králíků opět dvakrát. Každý králík dostal 0,01 ml inzulínu, tak aby toto množství tvořilo jednu inzulínovou jednotku. Výsledky jsou uvedeny na obr. 2 a v tabulce 2.

Tabulka 2

Čas v hodinách	0	0,5	1,5	3,0	5,0	7,0	9,0
ARI a NPH	88,0	45,9	34,2	43,5	71,6	84,2	88,6
PSI	87,2	59,3	47,1	45,2	51,9	58,0	64,3

Uvedené výsledky potvrzují rychlý nástup účinku u komplexu protaminu s inzulínem stejně jako dlouhé trvání tohoto účinku.

Bylo provedeno srovnání tří typů neutrálního protaminu a sodné soli inzulínu v kombinaci s 0,02 mg zinku na 100 jednotek inzulínu. Každý z inzulínových přípravků obsahoval 0,02 mg zinku na 100 inzulínových jednotek. Zinek byl přidáván proto, aby mohlo být stanoveno případné působení zinku na rychlý nástup účinku nebo na prodloužené působení přípravku. Jak je z vý-

sledků zřejmé, nebyl zjištěn žádný nepříznivý účinek v tomto smyslu.

Srovnávány byly tři přípravky, a to vepřový inzulín, hovězí inzulín a směs obsahující 75 % hovězího inzulínu a 25 % vepřového inzulínu.

Každá ze zkoušek byla provedena na šesti králících, a to jedinou injekcí 0,01 ml přípravku s obsahem 1 jednotky inzulínu. Výsledky jsou uvedeny na obr. 3 a v tabulce 3.

Tabulka 3

Hladina krevního cukru mg %

Čas v hodinách	0	1,5	3,0	5,0	7,0	9,0
vepřový inzulín	80,3	41,5	44,5	55,4	73,0	76,7
směs	80,2	40,5	37,6	53,1	60,7	65,6
hovězí inzulín	85,5	42,6	35,3	38,5	53,4	63,0

Vepřový inzulín má rychlý nástup účinku, přestože trvání účinku nebývá tak dlouhé, jako u ostatních inzulínových přípravků. Hovězí inzulín a smíšený přípravek mají i rychlý nástup účinku i dlouhé trvání.

Mimoto je třeba se zmínit o tom, že malé množství zinku bylo přidáváno i ke komplexu sodné soli inzulínu s protaminem. Bylo totiž zjištěno, že dvojmocné kovy, jako je zinek nemají být přítomny ve velkých množstvích již v průběhu tvorby sodné soli inzulínu. Inzulín byl ke komplexu přidáván proto, aby bylo prokázáno, zda má zinek nějaký vliv na inzulínový komplex. Z výsledků je zřejmé, že zinek ani nesnižoval ani nezvyšoval léčebnou hodnotu přípravku.

Vynález bude osvětlen následujícími příklady.

Příklad 1

Krystalický hovězí inzulín ve formě své sodné soli byl připraven takto:

Inzulín byl extrahován z hovězí slinivky břišní okyselenou směsí vody a alkoholu, extrakt byl koncentrován destilací ve vakuu a částečně čištěn frakčním srážením chloridem sodným a izoelektrickým srážením. Inzulín byl dále čištěn krystalizací v alkalickém prostředí při pH 8,2. Výsledné krystalky byly rozpuštěny v 0,5 N kyselině octové a dále podrobeny gelové filtraci na přípravku Sephadex G-50 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Švédsko).

Eluát, který sestával z 0,5 N roztoku kyseliny octové a obsahoval inzulín, byl alkalizován až na pH 8,2 1,0 N roztokem hydroxidu sodného a míchán 1 hodinu při teplotě místnosti. Krystalky sodné soli inzulínu byly odděleny filtrací a promyty 2% roztokem chloridu sodného. Promyté krystalky byly pak smíseny s absolutním alkoholem za energického míchání a odděleny filtrací. Po druhém promytí absolutním alkoholem byly krystalky promyty éterem a usušeny ve vakuu.

Výsledná krystalická sodná sůl hovězího inzulínu měla tyto vlastnosti:

účinnost	25,08 jednotek/mg
dusík	15,82 %
obsah vody	8,0 %
barevný index	0,005 pro 1% roztok při 340 nm.

3,98 g sodné soli inzulínu bylo rozpuštěno v 990 ml apyrogenní vody s obsahem 2,27 g fenolu a 1,5 ml 10% kyseliny solné. pH tohoto roztoku bylo pak upraveno na 7,4 přidáním 1,7 ml 10% hydroxidu sodného. Imunologické zkoušky ukázaly, že účinnost inzulínu je 101,3 jednotek/ml. Tento roztok byl sterilizován filtrací, pak byl plněn do ampulí v množství 1,0 ml na ampuli a ampule byly i s obsahem lyofilizovány za sterilních podmínek, čímž byl získán v každé ampuli sušený přípravek sodné soli inzulínu. Tento přípravek byl v této formě skladován až do použití.

Do každé z ampulí bylo uvedeno dostatečné množství isotonického ředidla a inzulín byl rekonstituován tak, že obsahoval 101,3 jednotek inzulínu v 1 ml prostředí.

Izotonické ředidlo sestávalo z 0,4 mg protaminsulfátu/ml, 1,6 % glycerinu a 0,25 % fenolu (váha/objem). Ředidlo mělo pH 7,4. Po přidání této kapaliny k sušené sodné soli inzulínu došlo okamžitě ke tvorbě komplexu protaminu se sodnou solí inzulínu. Tento komplex bylo možno pozorovat jako velmi jemně rozptýlenou sraženinu. Tato sraženina vytvořila suspenzi dostatečně jemnou, takže ji bylo možno odebírat injekční stříkačkou a přitom bylo možno zajistit stejné množství inzulínu v každém z odebraných podílů.

Příklad 2

V příkladu 2 je prokázána výborná stá-

lost komplexu protaminu s inzulínem. Neutrální PSI, užitý v tomto příkladu, byl připraven podle příkladu 1 s tím rozdílem, že izotonické ředidlo obsahovalo 1,2 mg protaminu v ml.

Každá ze zkoušek byla provedena na 9 králících. Přípravek byl skladován při teplotě 25 °C v intervalu mezi jednotlivými zkouškami ve formě suspenze v izotonickém ředidle. Stejně jako v předchozích pokusech bylo králíkům injekčně aplikováno 0,01 ml přípravku.

Výsledky jsou znázorněny na obr. 4 a uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4

Hladina krevního cukru v mg %

Čas v hodinách	0	1,5	3,0	5,0	7,0	9,0
na počátku	91,0	51,2	43,4	54,0	59,5	65,8
po 1 týdnu	84,1	49,3	43,2	48,4	52,1	61,2
po 2 týdnech	78,3	45,0	33,5	37,6	48,9	54,6
po 4 týdnech	95,3	40,9	29,8	36,6	45,7	55,8

Údaje v tabulce 4 jasně prokazují, že i když je izotonický roztok komplexu protaminu se sodnou solí inzulínu skladován při 25 °C, je velmi stálý v tom smyslu, že účinnost inzulínu je uchována i pokud jde o rychlý nástup účinku i pokud jde o jeho dlouhé trvání.

Příklad 3

V příkladu je uvedena tvorba komplexu protaminu s amonnou solí inzulínu, lithnou

solí inzulínu a draselnou solí inzulínu, stejně jako se sodnou solí inzulínu z příkladu 1.

Každá ze svrchu zmíněných solí byla utvořena způsobem podle příkladu 1, to znamená, že po tvorbě soli byl její roztok smísen s izotonickým roztokem, který obsahoval 0,4 mg protaminsulfátu na ml. Výsledný roztok byl pak injekčně podán 18 králíkům způsobem stejným jako v příkladu 1. Výsledky jsou znázorněny na obr. 5 a v tabulce 5.

Tabulka 5

Hladina krevního cukru v mg %

Čas v hodinách	0	1,5	3,0	5,0	7,0	9,0
amonná sůl	86,1	42,1	51,6	81,5	79,4	88,9
lithná sůl	87,1	38,6	38,6	60,2	75,9	81,1
draselná sůl	86,6	42,9	50,8	67,1	74,6	79,4
sodná sůl	80,1	36,9	36,1	51,1	60,6	70,9

Přestože sodná sůl má dlouhodobý účinek i ostatní typy solí mají poměrně velmi dlouhodobé účinky na snížení krevního cukru.

Příklad 4

Příklad dokládá stálost komplexu protaminu se sodnou solí inzulínu. Komplex byl připraven stejně jako v příkladu 1 použitím protaminsulfátu v koncentraci 0,4 mg/ml v izotonickém ředidle. Hotový komplex byl rozdělen do několika zkumavek, které byly odstředěny a supernatant byl slit. Sražení-

na byla promyta 15 ml absolutního alkoholu a pak 15 ml éteru. Promytá sraženina byla pak usušena ve vakuu při teplotě místnosti.

Takto usušený výsledný produkt byl znovu rozpuštěn nebo uveden v suspenzi v neutrálním izotonickém ředidle, stejného složení jako svrchu až na to, že neobsahoval protaminsulfát. Pak byla určena účinnost této suspenze a bylo zjištěno, že se pohybuje v rozmezí 88 až 95 jednotek/ml, takže zřejmě došlo k malým ztrátám inzulínu při

promývání komplexu protaminu se sodnou solí inzulínu před sušením ve vakuu.

Zkoušky byly prováděny stejně jako v předchozích příkladech na 9 králících. Úda-

je jsou uvedeny v tabulce 6. Pokus s lyofilizovaným materiálem byl proveden tak, že komplex byl lyofilizován až po vytvoření druhé suspenze ve vodě.

Tabulka 6

Hladina krevního cukru mg %

Čas v hodinách	0	0,5	1,0	3,0	5,0	7,0	9,0
sušeno ve vakuu	82,0	52,5	57,3	67,8	76,7	74,3	77,3
lyofilizováno	85,4	44,7	45,6	53,1	78,9	80,7	80,0

Oba přípravky způsobovaly podstatné snížení hladiny krevního cukru.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby komplexu inzulínové soli s protaminem, vyznačující se tím, že se při pH 6,5 až 8,0 uvede v reakci ve vodném prostředí protamin a zinku a těžkých kovů prostá sůl inzulínu s alkalickým kovem nebo amonná sůl inzulínu tak, že na každých 100 jednotek inzulínu se přidá 0,2 až 1,5 mg protaminu, za vzniku suspenze ve vodě nerozpustného komplexu.

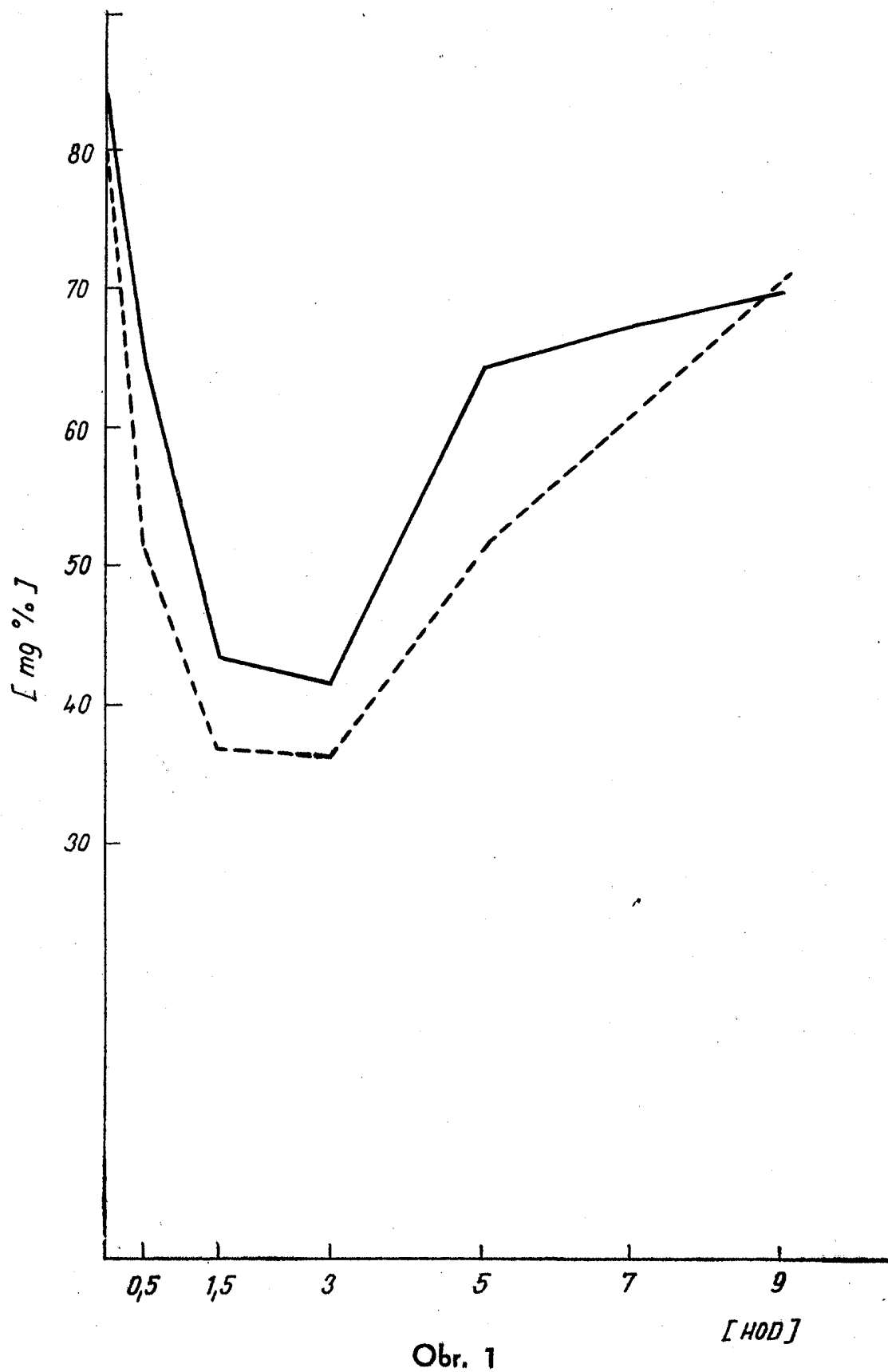
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se

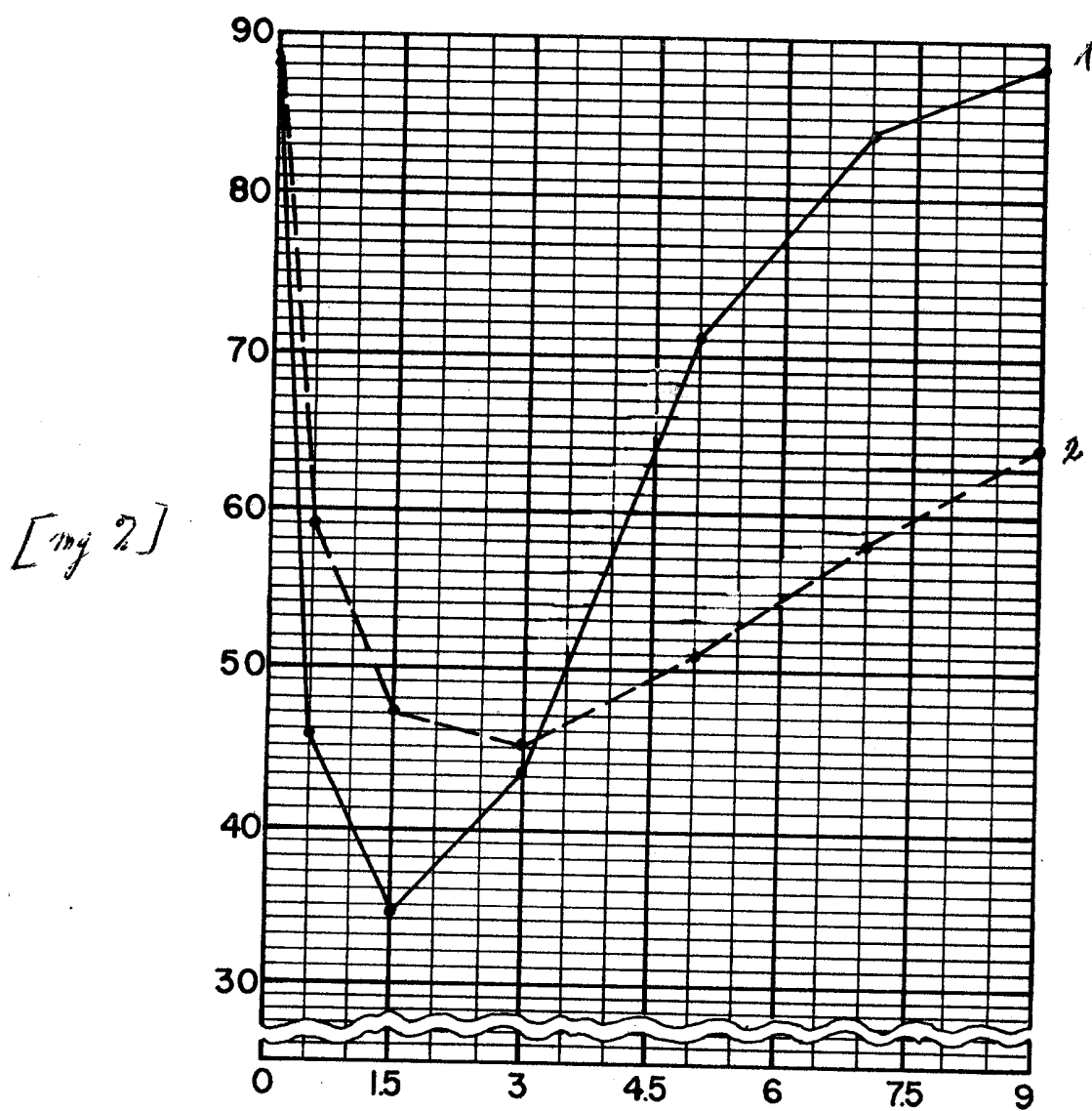
tím, že jako vodného prostředí se užije izotonického roztoku.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že jako inzulínové soli se užije sodné soli inzulínu.

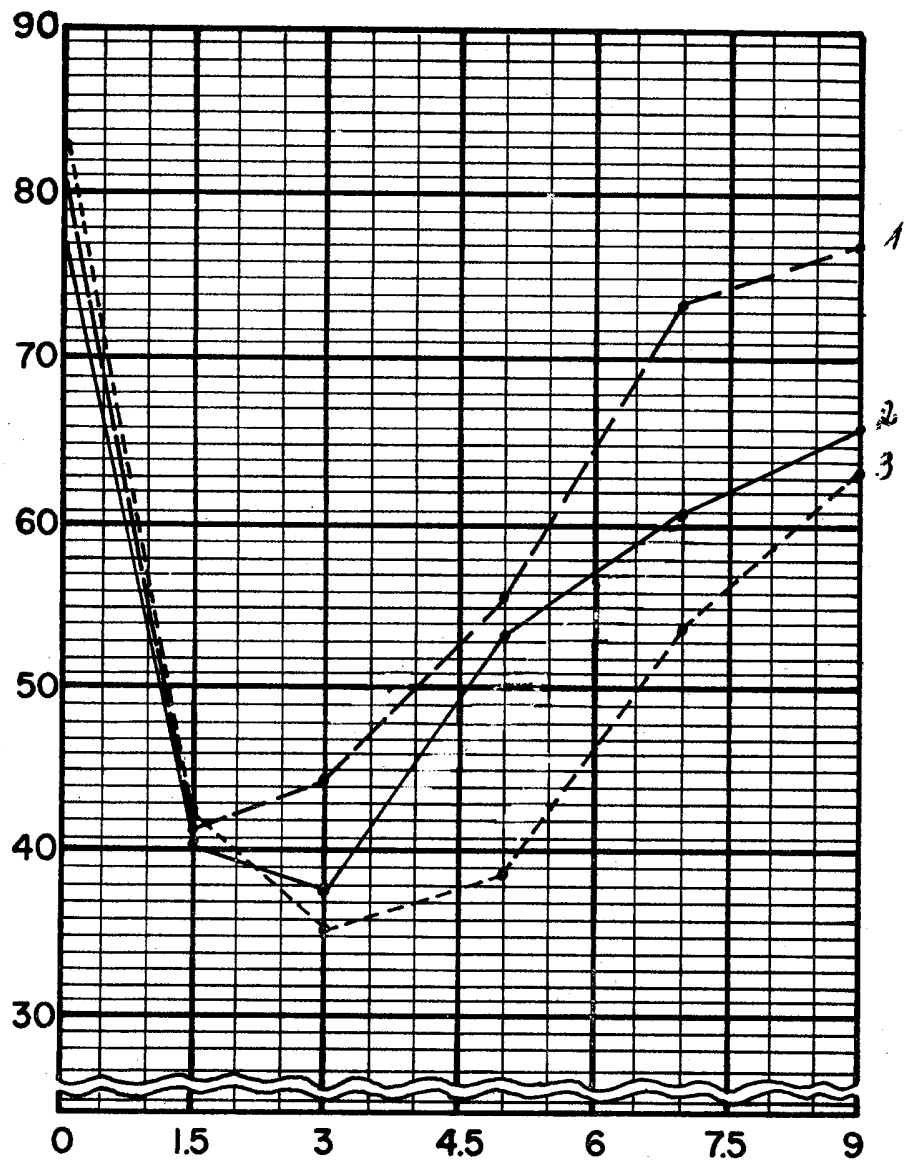
4. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se získaný nerozpustný komplex izoluje z vodného prostředí a jeho obsah vody se sníží pod 10 hmotnostních %.

6 listů výkresů

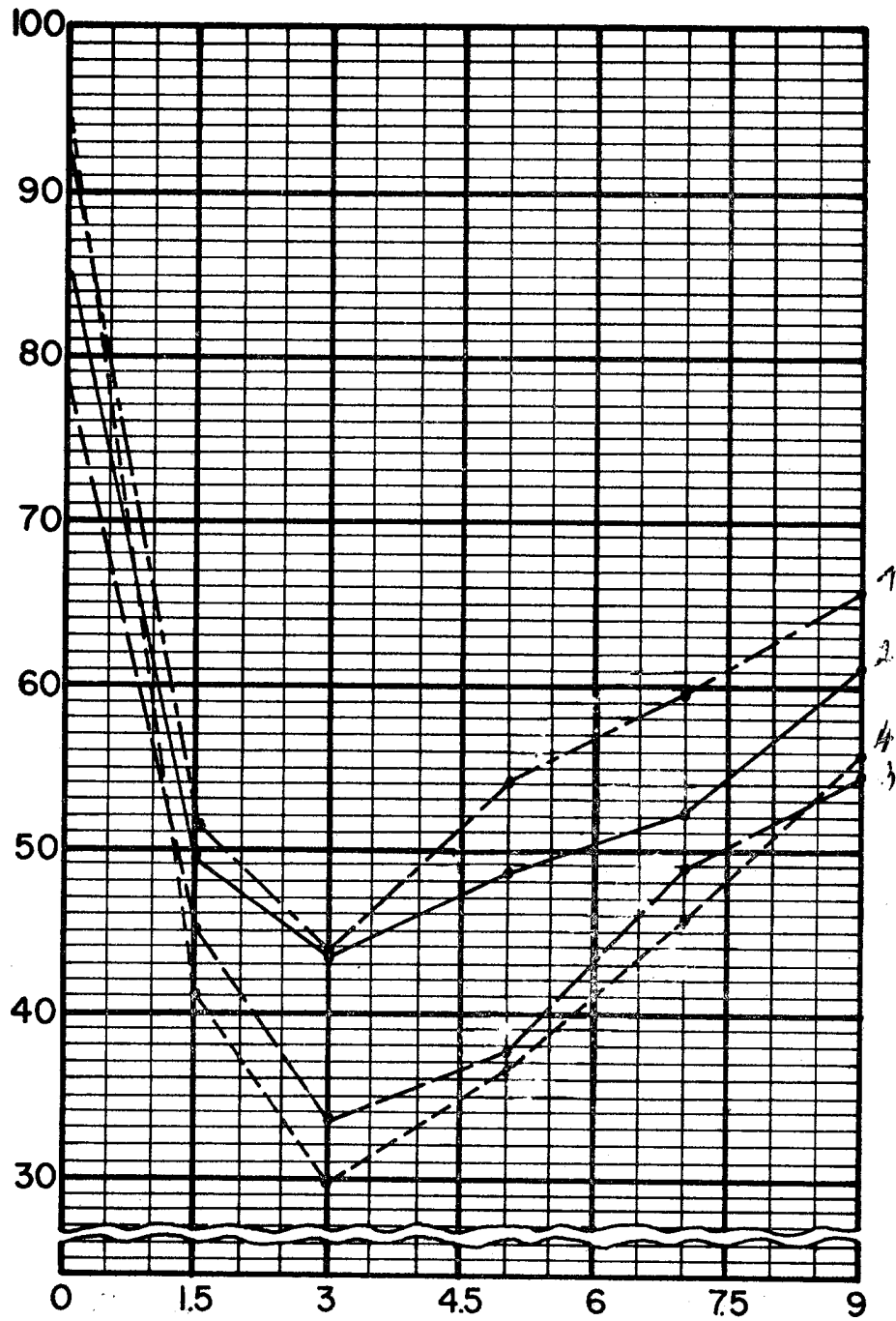




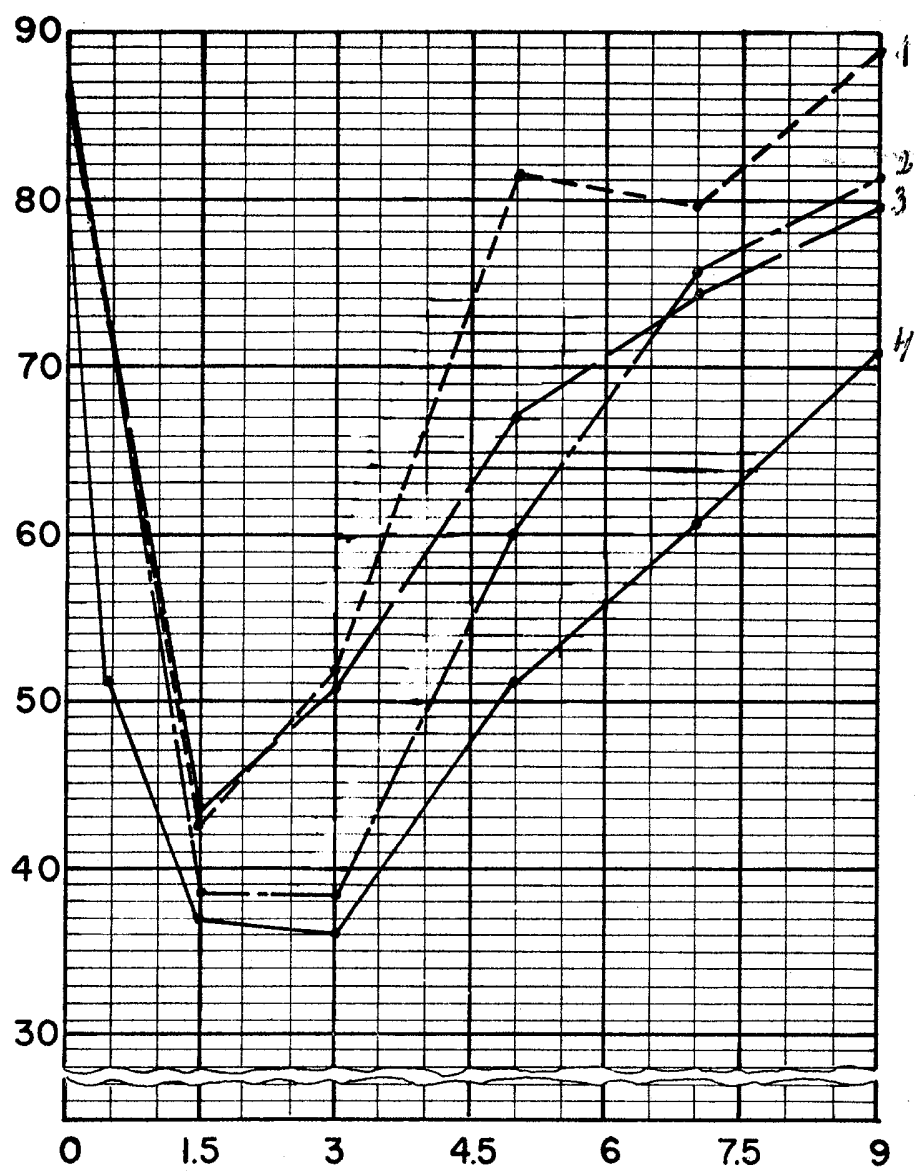
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5

