



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 11.03.76 (P. 187886)

Pierwszeństwo _____

Zgłoszenie ogłoszono: 10.10.77

Opis patentowy opublikowano: 30.12.1978

CZYTELNIA

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Int. Cl² A61K 35/38

Twórcy wynalazku: Tadeusz Wojtarowicz, Felicjan Mozołowski, Halina Pazdro, Zygmunt Zborucki, Gabriel Stelmaszak, Eugenia Serba, Jadwiga Łoś

Uprawniony z patentu: Jeleniogórskie Zakłady Farmaceutyczne „Polf”,
Przedsiębiorstwo Państwowe, Jelenia Góra
(Polska)

Sposób otrzymywania suchych koncentratów zawierających czynnik przeciwanemiczny

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania suchych koncentratów, zawierających czynnik przeciwanemiczny, tak zwany czynnik wewnętrzny (intrinsic factor), z błony śluzowej żołądków wieprzowych, względnie ich części, zawierających głównie ten czynnik, to znaczy odźwierników.

Koncentraty czynnika przeciwanemicznego znajdują zastosowanie do sporządzania różnych farmaceutycznych preparatów przeciwanemicznych, zawierających witaminę B₁₂ czyli główny czynnik krwiotwórczy, który jest przyswajalny przy podawaniu doustnym wyłącznie w obecności czynnika wewnętrznego.

W literaturze patentowej opisano szereg sposobów wydzielania i oczyszczania czynnika wewnętrznego, które są jednak skomplikowane i uciążliwe, zwłaszcza przy stosowaniu w dużej skali produkcyjnej. I tak na przykład ekstrakcje przy pomocy wodnych roztworów czynników proteolitycznych podane w opisach patentowych Stanów Zjednoczonych Ameryki nr nr 2937120, 3020204 lub opisie patentowym francuskim nr 1095593 są kosztowne z racji otrzymywania dużej ilości ekstraktów o małym stężeniu czynnika wewnętrznego, względnie stosowania uciążliwych i długotrwałych operacji, takich jak dializa i liofilizacja. Również metoda opisana w opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3015608, polegająca na ekstrakcji czynnika wewnętrznego z błony odźwiernika dwu- do pięciokrotną objętością wody

2

i suszenie tak otrzymanych rozcieńczonych ekstraktów w suszarkach rozpyłowych, daje produkt, zawierający duże ilości balastów białkowych i tłuszczów, obniżających jego aktywność.

5 Metody wydzielania czynnika wewnętrznego z roztworów przez wysalanie solami, jak siarczanem amonowym lub sodowym, podane w brytyjskim opisie patentowym nr 951984 i polskim nr 41903, są wysoce kosztowne ze względu na konieczność stosowania czystych odczynników, a uzyskiwany produkt jest mocno zanieczyszczony związkami nieorganicznymi, obniżającymi jego aktywność.

Stwierdzono, że można prostym sposobem otrzymać suche koncentraty czynnika wewnętrznego z błony śluzowej żołądków wieprzowych lub ich części odźwiernikowej poprzez przeciwpłdową ekstrakcję wodną rozdrobnionej śluzówki, prowadzoną w temperaturze 5 do 10°C w czasie 1 do 2 godzin w środowisku zbliżonym do obojętnego, korzystnie przy pH=6—8, w którym nie występuje szkodliwe dla procesu działania enzymów trawien-
15 nych śluzówki. Ekstrakty oddziela się od tkanki śluzowej przez wirowanie, po czym ekstrakt pierwszy o dużej, jak dla tego rodzaju roztworów, koncentracji czynnika wewnętrznego, wynoszącej 2—3%, kieruje się do dalszego przerobu, a pozostałe ekstrakty, powstające w przeciwpłdowej ekstrakcji, zawierające niższą koncentrację czynnika wewnętrznego, zwraca się do następnych kolejnych ekstrakcji świeżej porcji śluzówki.
25
30

Ekstrakt pierwszy, nie wymagający zateżenia ze względu na duże stężenie czynnika wewnętrznego, zakwasza się za pomocą kwasów mineralnych i/lub silnie kwaśnych kationitów w formie wodorowej typu Wofatyt KPS lub Amberlit IR-120 do $\text{pH}=3,5-4,5$ i wytrąca balasty białkowe, których punkty izoelektryczne leżą w tym zakresie pH .

Wytrącone balasty białkowe odwirowuje się i wyrzuca, a klarowny filtrat suszy rozpyłowo i uzyskuje surowy, suchy koncentrat czynnika wewnętrznego, zawierający tłuszcze i substancje barwne, obniżające jego aktywność.

W celu zwiększenia aktywności produktu uzyskany surowy koncentrat czynnika wewnętrznego miesza się w temperaturze pokojowej z rozpuszczalnikami organicznymi z grupy chlorowcowęgłowodów alifatycznych, korzystnie z trójchloroetylenem i przez filtrację oddziela rozpuszczalnik łącznie z zanieczyszczeniami, zawierającymi tłuszcze i substancje barwne, a osad suszy pod próżnią w temperaturze do 30°C i uzyskuje oczyszczony suchy koncentrat czynnika wewnętrznego, używany w połączeniu z witaminą B_{12} , do sporządzania doustnych preparatów farmaceutycznych o działaniu przeciwanemicznym.

Gotowy koncentrat czynnika wewnętrznego standaryzuje się znanymi metodami mikrobiologicznymi na aktywność wiązania witaminy B_{12} w kompleks z czynnikiem wewnętrznym, łatwo przyswajalnym przy podawaniu doustnym: $1\text{ }\mu\text{g}$ witaminy B_{12} jest związany przez 5 do 10 mg czynnika wewnętrznego, w zależności od stopnia jego oczyszczenia. Wyniki badań aktywności czynnika wewnętrznego metodami mikrobiologicznymi są zgodne z badaniami radiologicznymi przy stosowaniu radioaktywnej witaminy B_{12} , zawierającej Co^{57} , a preparaty, sporządzone z wyżej opisanych koncentratów, są terapeutycznie czynne w badaniach klinicznych.

Sposób otrzymywania suchych koncentratów czynnika wewnętrznego wyjaśniają bardziej szczegółowo poniższe przykłady.

Przykład I. 200 kg mrożonej błony śluzowej żołądków wieprzowych rozdrabnia się i ekstrahuje przeciwwądowno, używając do pierwszej ekstrakcji 500 l porcji surowca zwierzęcego drugi ekstrakt, pochodzący z poprzedniej porcji ekstrahowanej śluzówki i zawierający już czynnik wewnętrzny. Ekstrakcję prowadzi się przez 2 godziny w temperaturze poniżej 10°C , po czym oddziela się pierwszy ekstrakt od tkanki mięsnej na wirówce. Oddzieloną tkankę mięsną poddaje się drugiej ekstrakcji przy pomocy 300 l wody o $\text{pH}=6-8$; oddzielony drugi ekstrakt w ilości około 280 l wykorzystuje się do pierwszej ekstrakcji następnej porcji śluzówki. Ekstrakt pierwszy w ilości 200—240 l o zawartości 2—3% suchej masy zakwasza się 10% kwasem solnym do $\text{pH}=3,5-4,5$ i wytrąca balasty białkowe o punkcie izoelektrycznym, leżącym w tym przedziale pH . Wytrącone balasty białkowe oddziela się na ultrawirówce i odrzuca jako odpad, a uzyskany klarowny filtrat zateża się do sucha w typowych wyparkach rozpyłowych. Uzyskuje się około 2,5 kg surowego czynnika wewnętrznego w postaci kremowego proszku, posiada-

jącego zdolność wiązania $1\text{ }\mu\text{g}$ witaminy B_{12} w 10—15 mg substancji.

Przykład II. 200 kg mrożonej błony śluzowej odźwierników żołądków wieprzowych rozdrabnia się i ekstrahuje przeciwwądowno, jak podano w przykładzie I. Ekstrakt pierwszy w ilości 200 do 240 l o zawartości 2—3% suchej masy zadaje się przy mieszanii 2—2,5 kg kationitu w formie H^{+} (Wofatyt KPS lub Amberlit IR120) aż do osiągnięcia $\text{pH}=3,5-4,5$. W trakcie dodawania kationitu w wyniku wymiany jonowej uwalnia się kation H^{+} , zakwaszający ekstrakt i powodujący wytrącenie balastów białkowych, nie zawierających czynnika wewnętrznego. Wytrącone białka odwirowuje się na ultrawirówce łącznie z kationitem, a klarowny ekstrakt przerabia dalej, jak w przykładzie I. Uzyskuje się około 2,5 kg surowego czynnika wewnętrznego w formie suchego proszku, który wiąże aktywnie $1\text{ }\mu\text{g}$ witaminy B_{12} w 10—15 mg substancji.

Przykład III. 2,5 kg surowego czynnika wewnętrznego, otrzymanego według przykładu I i II w postaci proszku, wiążącego aktywnie $1\text{ }\mu\text{g}$ witaminy B_{12} w 10—15 mg substancji, poddaje się w temperaturze pokojowej dwukrotnej ekstrakcji pięcio litrowymi porcjami trójchloroetyleny, mieszając każdorazowo przez 1—2 godzin i odsączając fazę ciekłą. Odtłuszczony osad suszy się pod próżnią w temperaturze do 30°C .

Uzyskuje się 2—2,2 kg odtłuszczonego i pozbawionego substancji barwnych czynnika wewnętrznego w formie suchego proszku, który wiąże $1\text{ }\mu\text{g}$ witaminy B_{12} w 5—10 mg substancji.

Tak uzyskany koncentrat czynnika wewnętrznego miesza się z ekwiwalentem witaminy B_{12} , dodaje obciążalniki i nadaje gotową formę leku w postaci granulek lub tabletek.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania suchych koncentratów, zawierających czynnik przeciwanemiczny, tak zwany czynnik wewnętrzny (intrinsic factor) z błony śluzowej żołądków wieprzowych lub ich części odźwiernikowej, **znamienny tym**, że rozdrobnioną śluzówkę poddaje się przeciwwądownej ekstrakcji wodnej w temperaturze $5-10^{\circ}\text{C}$ przy pH zbliżonym do obojętnego, korzystnie $\text{pH}=6-8$, ekstrakty oddziela od części stałych przez wirowanie, ekstrakt główny, zawierający największe stężenie czynnika wewnętrznego zakwasza się do $\text{pH}=3,5-4,5$ wytrącony osad białek odwirowuje, a klarowny filtrat suszy rozpyłowo i uzyskany surowy, suchy koncentrat czynnika wewnętrznego oczyszcza się z tłuszczu i substancji barwnych przez wymieszanie w temperaturze pokojowej z rozpuszczalnikami organicznymi z grupy chlorowcowęgłowodów alifatycznych, odsącza rozpuszczalnik z zanieczyszczeniami, a osad suszy pod próżnią w temperaturze do 30°C .

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że uzyskany z przeciwwądownej ekstrakcji wodnej śluzówki główny ekstrakt zakwasza się do żąda-

nego pH za pomocą kwasów mineralnych i/lub silnie kwaśnych kationitów w formie wodorowej.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że uzyskany z przeciwprądowej ekstrakcji wodnej

śluzówki ekstrakt główny, po usunięciu balastów białkowych i wysuszeniu rozpyłowym, poddaje się ekstrakcji chlorowcowęglowodorami alifatycznymi, korzystnie trójchłotylenem.