



AG 1 K 14/100

Urząd Patentowy
Warszawa

POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ

OPIS PATENTOWY

Nr 40829

Kl. 30 h, 2/04

VEB Arzneimittelwerk Dresden*)

Radebeul, Niemiecka Republika Demokratyczna

Sposób wytwarzania wysokoaktywnych preparatów hormonu adrenokortykotropowego z przedniego płata przysadki mózgowej

Patent trwa od dnia 3 lipca 1956 r.

Wynalazek dotyczy sposobu otrzymywania wysokoaktywnego preparatu hormonu adrenokortykotropowego z przedniego płata przysadki mózgowej.

Wiadomo, że z przedniego płata przysadki mózgowej można izolować hormon stymulujący korę nadnercza. Hormon ten znany pod nazwą ACTH, nabrał w ostatnich latach dużego znaczenia w terapii i diagnostyce.

Otrzymywanie preparatów ACTH o wysokiej czystości według znanych metod jest uciążliwe i związane z wysokimi kosztami. Oprócz tego przy izolowaniu i procesie oczyszczania ACTH następują znaczne straty, które obniżają wydajność produktu końcowego.

Sposób wytwarzania tego hormonu opiera się na nowoczesnych metodach frakcjonowania białek. Według tych metod materiał wyjściowy, mianowicie przysadki mózgowe świń, owiec, wielorybów lub bydła, ekstrahuje się kilkakrotnie za pomocą silnie zakwaszonych wodnych

roztworów acetonu. Z połączonych ekstraktów otrzymuje się następnie przez zwiększenie stężenia acetonu frakcję zawierającą ACTH. Tak otrzymany surowy hormon o przeciętnej mocy 0,5 IE/mg oswobadza się od pozostałych hormonów przedniego płata przez przesunięcie pH albo przez frakcjonowanie wysalaniem. Z oczyszczonego i dializowanego ekstraktu strąca się acetonem ACTH o czystości około 2 IE/mg. Zawiera on jednak jeszcze znaczne ilości hormonów tylnego płata przysadki mózgowej oraz małe ilości hormonu wzrostu, laktacji i gonadotropowego. Zanieczyszczenia inaktywuje się za pomocą kwasów i podwyższonej temperatury. Procedura ta jest jednak niewskazana, gdyż następuje jednocześnie inaktywacja pewnej ilości ACTH.

Wiadomo, że dalsze wzbogacenie produktu w ACTH można przeprowadzić różnymi sposobami, na przykład przez adsorbcję na wymiennicach kationów albo przez hydrolizę ACTH kwasem lub pepsyną i następującą po tym chromatografią.

*) Właściciel patentu oświadczył, że twórcą wynalazku jest dr Gerhard Schäfer.

Poza tym wiadomo, że specjalnie dogodny jest sposób wzbogacania produktu w ACTH przez adsorpcję na oksycelulozie. Zastosowanie tego sposobu po procesie oczyszczania daje w rezultacie produkt o tak wysokim stopniu czystości, że może on być bez szkody zastosowany nawet dożylnie.

Celem wynalazku było opracowanie takiego sposobu otrzymywania ACTH, który zezwoliłby na podwyższenie wydajności czystego hormonu.

Stwierdzono, że metoda adsorpcji na oksycelulozie nadaje się do otrzymywania wysokoaktywnych preparatów ACTH, nie zawierających zanieczyszczeń innych hormonów przysadki mózgowej, bezpośrednio z surowego hormonu bez zastosowania procesów oczyszczania. Metoda ta jest szczególnie dogodna dlatego, ponieważ normalnie odizolowanie ACTH od poszczególnych hormonów tylnego płata przysadki mózgowej przebiega bardzo trudno. Znane sposoby odizolowywania ACTH od innych hormonów są bardzo skomplikowane (frakcjonowanie) i prowadzą do otrzymania ACTH z małą wydajnością.

Sposobem według wynalazku można izolować dalsze hormony przysadki mózgowej z pozostałości, nie zaadsorbowanej na oksycelulozie i zużytkować je do celów terapeutycznych, podczas gdy według dotychczasowych metod hormony te ulegały zniszczeniu działaniem kwasów i temperatury (jak już wyżej wspomniano), przy czym również ulegała inaktywacji znaczna część ACTH.

Przykład. 0,5 kg świeżych zamrożonych przysadek mózgowych miażdży się jak najdokładniej i zalewa dwoma litrami mieszaniny składającej się z 2 l acetonu, 0,25 l wody i 50 ml stężonego kwasu solnego. Do tak otrzymanej zawiesiny wprowadza się dwutlenek węgla w postaci stałej, w celu obniżenia temperatury do -20°C — -25°C . Następnie mieszaninę doprowadzoną w ciągu 20 minut do temperatury $+20^{\circ}\text{C}$ miesza się intensywnie w ciągu godziny. Powstały osad odsąca się i ekstrahuje jeszcze raz 1 litrem 80%-ego acetonu. Połączone ekstrakty wlewa

się do 15 l acetonu ochłodzonego do -5°C , a wytrącony osad przemywa dokładnie acetonem i suszy w próżni. Otrzymany surowy ACTH w ilości około 16 g, o wartości 0,5 IE/mg, rozpuszcza się w 500 ml 0,1 molowego kwasu octowego o $\text{pH} = 3-4$. Do roztworu dodaje się 1,5 g oksycelulozy (zawartość karboksylu 11—12%), uprzednio przemytej 0,1 molowym kwasem solnym, wodą i 0,1 molowym kwasem octowym. Mieszaninę pozostawia się w ciągu 24 godzin w temperaturze pokojowej, stale mieszając. Następnie odsąca się oksycelulozę i przemywa dokładnie najpierw 0,1 molowym kwasem octowym, potem wodą destylowaną. Roztwór powtórnie zadaje się 0,8 g oksycelulozy, mieszając przez 12 godzin, następnie odsąca się oksycelulozę i przemywa jak wyżej kwasem octowym i wodą.

Następnie oksycelulozę zawiesza się w 250 ml 0,1 molowego kwasu solnego i ekstrahuje przez 12 godzin przy silnym mieszaniu. Z kolei mieszaninę odsąca się, a przesącz wlewa się do 12-krotnej ilości acetonu, ochłodzonego uprzednio do -5°C . Aceton zlewa się z nad powstałego osadu, a osad uwalnia od resztek acetonu przez odwirowanie. Otrzymany hormon kilkakrotnie przemywa się absolutnym acetonem, odwirowuje i suszy w próżni. Otrzymuje się 0,29 g ACTH o mocy 25 IE/mg (w sumie 7250 IE). Opisanym sposobem otrzymano z surowego produktu 90,6% hormonu wysokoaktywnego.

Zastrzeżenia patentowe

Sposób wytwarzania wysokoaktywnych preparatów hormonu adrenokortikotropowego (ACTH) z przedniego płata przysadki mózgowej, przy czym jako produkt wyjściowy stosuje się surowy hormon adrenokortikotropowy, znamienny tym, że hormon adsorbuje się na oksycelulozie, a następnie eluuje kwasem solnym, po czym z kwaśnego roztworu wytrąca się go acetonem w postaci czystej, wysoko aktywnej.

VEB Arzneimittelwerk Dresden
Zastępca: Kolegium Rzeczników Patentowych.