

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

89803

Patent dodatkowy
do patentu _____

MKP C07g 7/00

Zgłoszono: 27.02.74 (P. 169 122)

Pierwszeństwo: _____

Int. Cl². C07G 7/00

Zgłoszenie ogłoszono: 01.10.75

Opis patentowy opublikowano: 30.06.1977

Twórcy wynalazku: Halina Goch, Stanisława Sabalińska, Małgorzata Kalicińska-Buraczewska,
Kazimierz Zakrzewski, Henryk Chojnowski, Tadeusz Michałek

Uprawniony z patentu: Centralne Laboratorium Surowic i Szczepionek,
Warszawa (Polska)

Sposób wyodrębniania i zagęszczania albumin obecnych w ekstraktach łożyskowych

Przedmiotem wynalazku jest sposób wyodrębniania i zagęszczania albumin, obecnych w ekstraktach łożyskowych.

Łożyska ludzkie są łatwo dostępnym i tanim źródłem białek surowicy krwi, a przede wszystkim gamma-globulin i albumin. Zawartą w łożyskach surowicę zazwyczaj ekstrahuje się fizjologicznym roztworem chlorku sodu. Uzyskane w ten sposób ekstrakty łożyskowe, poza białkami surowicy krwi, zawierają białka tkankowe i hemoglobinę w ilości, przekraczającej 50% ogólnej ilości białka w roztworze. Niskie stężenie białek surowicy przy równocześnie wysokiej zawartości hemoglobiny w ekstraktach łożyskowych sprawia, że klasyczne metody frakcjonowania białek surowicy alkoholem znajdują zastosowanie tylko do wyodrębniania gamma-globulin. Dalsze frakcjonowanie ekstraktów łożyskowych metodami klasycznymi w celu wyizolowania obecnych jeszcze albumin surowicy ludzkiej prowadzi do uzyskania preparatu, zanieczyszczonego barwnikami hemowymi. Preparaty takie nie mogą być stosowane w lecznictwie.

Znany jest sposób otrzymywania albumin z ekstraktów łożyskowych (Gordon T.H., Hyndman L.A., Bloom T.C., Anderson H.D., Taylor H.L., McCall K.B., J.Am.Chem.Soc., t.75, nr 23, s.5858, 1953 r.). Stosowany w nim ekstrakt zawierał około 5% białka ogółem, z czego aż 80% stanowiła hemoglobina. Wieloetapowe, skomplikowane frakcjonowanie (6 wirowań dużych objętości płynów na wirówkach CEPA z szybkością 301/godz., 4 sączenia, zastosowanie jonowymiennej kolumny) prowadziło do otrzymania czystego preparatu albumin z wydajnością 29%. Opisany proces technologiczny był bardzo kosztowny ze względu na dużą ilość używanych wirówek, jak i niską wydajność końcowego preparatu. Według opisu patentowego Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3 497 492 (1970) metoda wyodrębniania albumin z płynów odpadowych po produkcji gamma-globulin opiera się na frakcjonowaniu dużych objętości stosunkowo rozcieńczonego roztworu albumin, co powoduje, że wydajność końcowego preparatu albumin jest także niska (41%).

Zagęszczenie ekstraktu łożyskowego znacznie poprawia wydajność albumin. Zagęszczenie nie może jednak być prowadzone sposobami zazwyczaj stosowanymi w przemyśle, to jest przez odparowanie, nawet pod zmniejszonym ciśnieniem, gdyż stopniowe zagęszczenie białka i soli w roztworze prowadzi do denaturacji albumin. Stosowanie zaś metod, które nie uszkadzają albumin, takich jak ultrafiltracja i liofilizacja, nie wchodzi

w rachubę, gdyż są to procesy o stosunkowo niskiej wydajności, niewspółmiernej z dużymi objętościami ekstraktów łożyskowych, które należy poddać zagęszczeniu. Wymagają one również kosztownych i drogiej eksploatacji urządzeń.

Sposób według wynalazku usuwa te trudności, pozwala bowiem na 10-krotne zagęszczenie albumin za pomocą szybkiego i wydajnego procesu chromatograficznego, który jednocześnie oddziela od albumin większość zanieczyszczeń hemoproteidowych. Istotą wynalazku jest zastosowanie jonowymiennej chromatografii dla wychwytywania albumin z roztworu, zawierającego alkohol etylowy o stężeniu do 20%, ewentualnie z dodatkiem alkoholu metylowego przy stężeniu chlorku sodu nie niższym niż 0,05 M w pH = 6,3–8,5. Do tego celu najbardziej przydatne są nierozpuszczalne wielocukry, w których grupy hydroksylowe zostały podstawione resztami aminowymi lub ich pochodnymi (np. DEAE sefadeks).

Istota chromatografii jonowymiennej polega na elektrostatycznym wiązaniu białek przez cząsteczki sorbenta o odmiennym ładunku. Wymywanie (elucję) frakcji białkowych przeprowadza się, stosując bufony o wzrastającym stężeniu chlorku sodu w granicach 0,1–0,3 M, który wypiera cząsteczki białka, elektrostatycznie związane z jonowymi sorbentem.

Ponieważ w pH zbliżonym do obojętnego ładunek elektrostatyczny albumin różni się od ładunku innych białek, znajdujących się w ekstraktach łożyskowych, istnieje możliwość oddzielania ich na drodze chromatografii jonowymiennej od większości białek balastowych, w odpowiednio dobranych warunkach pH i stężenia chlorku sodu.

Stężenie chlorku sodu musi być dobrane szczególnie starannie w momencie, gdy przeznaczony do zagęszczania ekstrakt jest w kontakcie z sorbentem. Zbyt niskie stężenie soli w roztworze może w tych warunkach spowodować wychwytywanie przez jonowymienny sorbent także hemoglobiny i innych białek balastowych. Natomiast wysokie stężenie elektrolitu w roztworze powoduje, że sorbent w tych warunkach traci zdolność do wychwytywania albumin.

Staranne dobranie stężenia elektrolitów w roztworze, przeznaczonym do wymywania albumin z sorbenta pozwala także na oddzielenie białek, mocniej związanych przez sorbent, niż albuminy. Jest to możliwe dzięki temu, że białka mocniej związane eluują się z jonowymiennego sorbenta przy wyższym stężeniu soli niż albuminy. Można więc tak dobrać stężenie soli w płynie eluującym, aby mocniej związane białka nie eluowały się wraz z albuminami i pozostały na jonowymiennym sorbencie.

P r z y k ł a d. Materiałem wyjściowym do izolowania albumin był płyn odpadowy, uzyskiwany w trakcie frakcjonowania gamma-globulin z ekstraktów łożyskowych. Zawierał on 20% alkoholu etylowego i 1,5% białka ogółem. Stężenie albumin w tym roztworze wynosiło 0,27%.

700 g namoczonego DEAE-sefadeksu A-50 zrównoważono 0,01 M buforem fosforanowym o pH = 7,0 w 0,02 M NaCl i przeniesiono do kolumny o średnicy 50 cm i wysokości 40 cm, umieszczonej w pomieszczeniu o temp. 4°C. Sefadeks w kolumnie zrównoważono 0,01 M buforem fosforanowym o pH = 7,0 w 0,02 M NaCl i 20% alkoholu etylowym.

300 l sklarowanego płynu odpadowego nałożono na kolumnę, podając go z szybkością 15 l/godz. Po przejściu całości płynu kolumnę przemyto 50 l 0,01 M buforu fosforanowego o pH = 7,0 w 0,04 M NaCl. Albuminy wymyło z sefadeksu 50 l 0,04 M buforu fosforanowego o pH = 7,0 w 0,15 M NaCl z szybkością 10 l/godz.

Eluat zbierano w porcjach po 5 l. Po przejściu przez kolumnę całości buforu odczytano ekstynkcję przy 280 nm roztworu w poszczególnych porcjach i połączono ze sobą roztwory, których ekstynkcja była równa lub wyższa niż 3.

Otrzymano 34,5 l roztworu o stężeniu białka 2,41%. Stężenie albumin w tym roztworze wynosiło 2,3%. Wydajność procesu wynosiła 95%.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wyodrębniania i zagęszczania albumin obecnych w ekstraktach łożyskowych, z n a m i e n n y t y m, że ekstrakt łożyskowy zawierający alkohol etylowy o stężeniu do 20%, ewentualnie z dodatkiem alkoholu metylowego, doprowadza się przed chromatografią do siły jonowej nie niższej niż 0,05 i pH w granicach 6,3–8,5 a następnie adsorbuje na anionowych sorbentach, najkorzystniej na nierozpuszczalnych wielocukrach, w których grupy hydroksylowe zostały podstawione resztami aminowymi lub ich pochodnymi, uprzednio doprowadzonych do pH w granicach 6,3–8,5 a następnie oddziela się albuminy od sorbenta roztworem buforowym o stężeniu chlorku sodu w granicach 0,1–0,3 M w pH = 6,3–8,5.