

URZĄD PATENTOWY w WARSZAWIE OPIS PATENTOWY

Nr 29542.

Kl. 12 p, 17/10.

I. G. Farbenindustrie Aktiengesellschaft, Frankfurt n. M.

MK 1 6070 45/00
A 61K 17/0

Sposób wytwarzania preparatów zawierających kallikreinę.

Zgłoszono 11 maja 1938 r.

Udzielono 15 stycznia 1941 r.

Pierwszeństwo: 14 maja 1937 r. (Niemcy).

Wiadomo, że preparaty kallikreinowe wytwarza się w ten sposób, że poddaje się autolizie trzustkę świńską w obecności kwasu octowego, produkt autolizy przesącza się, dializuje, strąca acetonem, następnie strącony osad przemywa się roztworem dwuwęglanu sodowego i ponownie dializuje. Przy tym kallikreinę uzyskuje się z wydajnością wynoszącą co najwyżej 18 000 jednostek/kg trzustki. Ten znany sposób sześć-stopniowy zajmuje wiele czasu przede wszystkim z powodu bardzo wielkich trudności oddzielania produktu autolizy i konieczności dwukrotnej dializy.

Stwierdzono, że w sposób prostszy i z o wiele lepszą wydajnością można wytwarzać preparaty hormonu krążenia, kalli-

kreiny, przez autolizę trzustek zwierzęcych, jeżeli produkt autolizy — ewentualnie po rozcieńczeniu — zada się roztworem koloidalnego tlenku żelaza, otrzymany roztwór oddzieli się od pozostałości po autolizie oraz od osadu strąconego tlenkiem żelaza, po czym ewentualnie można zastosować dializę.

Jako materiał wyjściowy stosuje się najlepiej trzustki bydlęce i świńskie. Autolizę można przeprowadzać w obecności kwasów, np. rozcieńczonego kwasu octowego lub solnego, albo zasad, jak ługu sodowego, węglanu sodowego lub wapniowego, substancji buforowych albo środków dezynfekcyjnych.

Okazało się, że otrzymuje się szczególnie duże wydajności, jeżeli autolizę

wspomnianych rozdrobnionych trzustek będzie się przeprowadzać bez dodatku elektrolitów i rozpuszczalników. Według tego sposobu uzyskuje się wydajność wynoszącą aż do 80 000 jednostek kallikreiny/kg trzustki.

Nie jest konieczne poddawanie produktu autolizy bezpośredniemu strącaniu tlenkiem żelaza, można bowiem zastosować również i sączenie. Aby ułatwić sączenie, zakwasza się produkt autolizy co najwyżej do wartości $p_H = 4,0$, a najlepiej $= 5,0$, i podczas sączenia dodaje się ewentualnie jeszcze elektrolitów, np. soli kuchennej.

Tak otrzymane preparaty są odpowiednie zarówno do podawania doustnego, jak i poza-jelitowego. W razie potrzeby można je dalej oczyszczać, np. przez adsorpcję za pomocą glinki.

Podczas strącania koloidalnie rozpuszczonym tlenkiem żelaza kallikreina nie strąca się, lecz ilościowo pozostaje w roztworze. Było to tym bardziej nieoczekiwane, że jak wiadomo, kallikreina jest pochłaniana prawie ilościowo wodorotlenkiem żelaza wytwarzanego w roztworze, np. z chlorku żelazowego i amoniaku, albo glinką wytwarzaną z alunu i amoniaku.

Dzięki niniejszemu wynalazkowi w porównaniu ze znaną metodą osiąga się kallikreinę o tym samym stopniu czystości, prawie z czterokrotnie większą wydajnością, przy czym czas trwania procesu pozostaje skrócony do $\frac{1}{10}$ czasu dotychczas stosowanego. Zamiast przeprowadzać proces niniejszy, jak dotychczas, w sześciu stopniach, można niniejszy sposób przeprowadzić w trzech stopniach.

Przykład I. Trzustkę uwolnioną od tłuszczu przepuszcza się przez maszynkę do mięsa. Z otrzymanej papki odważa się 5 kg i w 4 równych częściach umieszcza się w 4-ch słojach o pojemności 10 litrów każdy. Do każdego słoja wlewa się 3,75 li-

trów wody oraz 4,5 g lodowatego kwasu octowego i dobrze miesza. Każdy słoć zamyka się przedziurawionym korkiem i pozostawia w ciągu 72 godzin w temperaturze 37°C mieszając kilka razy dziennie. Po skończonej autolizie zawartość słoików wprowadza się do naczynia o pojemności w przybliżeniu 30 litrów i mocno mieszając dodaje się stopniowo 6 litrów 10%-owego koloidalnego roztworu tlenku żelaza (*Ferrum oxydatum dialisatum in lamellis*). Wytrąca się obfity osad. Mieszaninę reakcyjną miesza się w ciągu jednej godziny i przesącza. Sączenie odbywa się nadzwyczaj szybko. Otrzymany przesącz zobojętnia się ługiem sodowym i w wężach celofanowych pod toluenem dializuje się w ciągu 72 godzin za pomocą szybko przepływającej wody wodociągowej. Uzyskuje się kallikreinę z wydajnością wynoszącą 300 000 jednostek, przy czym jedna jednostka odpowiada 50 γ substancji organicznej.

Przykład II. Trzustkę uwolnioną od tłuszczu przepuszcza się przez maszynkę do mięsa. Z otrzymanej papki odważa się 5 kg i dzieli je na równe części, wprowadzając do 2 słoików o pojemności 10 litrów każdy. Papkę w tych słojach poddaje się autolizie w ciągu 72 godzin w temperaturze 37°C . Po skończonej autolizie zawartość słoików wprowadza się do 25 litrowego naczynia i mocno mieszając zadaje się stopniowo 15 litrami destylowanej wody. Mieszaninę reakcyjną miesza się w ciągu około godziny aż do dobrego zmieszania całej masy i stopniowo dodaje się 4 litry 10%-owego koloidalnego roztworu tlenku żelaza. Następnie powstały osad odsącza się i otrzymany przesącz poddaje się dializie w ciągu 72 godzin. Uzyskuje się kallikreinę z wydajnością wynoszącą 350 000 jednostek, przy czym jedna jednostka odpowiada 110 γ substancji organicznej.

Przykład III. Trzustkę uwolnioną od

tłuszczu przepuszcza się przez maszynkę do mięsa; z otrzymanej papki odważa się 5 kg i w równych częściach wprowadza do 4-ch słoików o pojemności 10 litrów każdy. Do każdego słoika wlewa się 3,75 litra wody oraz 4,5 g lodowatego kwasu octowego i dobrze miesza, po czym każdy słoik zamyka się przedziurawionym korkiem, pozostawia w ciągu 72 godzin w temperaturze 37°C; zawartość słoików miesza się kilka razy dziennie. Po skończonej autolizie zawartość słoików wlewa się do 25 litrowego naczynia i mocno mieszając nastawia się za pomocą HCl na wartość $p_H = 5,5$.

Następnie powstały osad odsącza się i mieszając zadaje przesącz 5 litrami 10%-owego koloidalnego tlenku żelaza. Powstaje obfity osad; przy czym p_H osiąga wartość 4,8. Osad odsącza się, a przesącz w węzłach ze zregenerowanej celulozy pod toluenem dializuje się za pomocą szybko przepływającej wody wodociągowej. Użykuje się kallikreinę z wydajnością wynoszącą 250 000 jednostek; jedna jednostka odpowiada 90 γ substancji organicznej.

Przykład IV. Trzustkę uwolnioną od tłuszczu przepuszcza się przez maszynkę do mięsa, z otrzymanej papki odważa się 5 kg i w równych częściach wprowadza się do 4-ch słoików o pojemności 10 litrów każdy. Do każdego słoika wlewa się 3,75 litra wody nasyconej tymolem i dobrze miesza. Każdy słoik zamyka się przedziurawionym korkiem, pozostawia się w ciągu 72 godzin w temperaturze 37°C i codziennie kilkakrotnie miesza. Po skończonej autolizie zawartość słoików wprowadza się do 25 litrowego naczynia i mocno mieszając zadaje 5 litrami 10%-owego kolo-

idalnego roztworu tlenku żelaza. Powstaje obfity osad, który odsącza się, a otrzymany przesącz w węzłach ze zregenerowanej celulozy pod toluenem dializuje się w ciągu 72 godzin za pomocą szybko przepływającej wody wodociągowej. Uzyskuje się kallikreinę z wydajnością wynoszącą 350 000 jednostek, przy czym jedna jednostka odpowiada 90 γ substancji organicznej.

Zastrzeżenia patentowe.

1. Sposób wytwarzania preparatów, zawierających kallikreinę, z trzustek zwierzęcych przez autolizę, znamieny tym, że produkt autolizy, ewentualnie po rozcieńczeniu, zadaje się roztworem koloidalnego tlenku żelaza, po czym powstały osad oddziela się, a otrzymany przesącz ewentualnie poddaje się dializie.

2. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że poddaje się autolizie rozdrobione gruczoły trzustkowe bez dodatku elektrolitów i rozpuszczalników, po czym produkt autolizy poddaje się strącaniu tlenkiem żelaza.

3. Sposób według zastrz. 1 i 2, znamieny tym, że produkt autolizy przed sączeniem zakwasza się do wartości p_H co najwyżej = 4,0, a najlepiej = 5,0, przesącza się, ewentualnie z dodatkiem elektrolitów, i przesącz strąca się tlenkiem żelaza.

I. G. Farbenindustrie
Aktiengesellschaft.
Zastępca: M. Skrzypkowski,
rzecznik patentowy.