



Patent dodatkowy
do patentu nr 93587

Zgłoszono: 16.12.76 (P. 194451)

Pierwszeństwo: 17.12.75 Republika
Federalna Niemiec

Zgłoszenie ogłoszono: 07.11.77

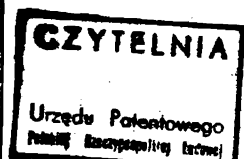
Opis patentowy opublikowano: 15.08.1980

Int. Cl.²

C07G 7/00

A61K 35/14

A61K 37/02



Twórca wynalazku _____

Uprawniony z patentu: Plasmesco A. G., Zug (Szwajcaria)

Sposób wydzielania albuminy z krwi, produktów z krwi, innych cieczy ustrojowych i ekstraktów tkankowych

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wydzielania albuminy z krwi, produktów z krwi, innych cieczy ustrojowych i ekstraktów tkankowych, według patentu głównego nr 93587.

Przy otrzymywaniu albuminy z krwi, produktów krwi, zawierających albuminy cieczy ustrojowych itp. uzyskuje się zawiesinę, zawierającą albuminy, która obok rozpuszczonej albuminy zawiera wytrącone substancje białkowe, w szczególności globuliny. W opisie patentu głównego nr 93587 opisano sposób wydzielania albuminy z krwi ludzkiej itp., który obejmuje następujące etapy. Pierwszy — oddzielanie plazmy od stałych i zwiększających krzepnięcie rozpuszczalnych składników krwi i — w razie potrzeby — otrzymywanie rozpuszczalnych składników nie-albuminowych. Drugi — strącanie globulin przez ogrzewanie pozostałej cieczy w obecności 7—12% objętościowych alkoholi o składzie $\text{CH}_3\text{-n(CH}_2\text{)-HO}$, gdzie $n = 0,1$ albo 2, i stabilizatorów albuminy, jak np. kaprylanu sodu, w temperaturze około 60—75°C i oddzielanie cieczy od globulin. Trzeci — zateżnianie albuminy z roztworu, zawierającego albuminy.

Oddzielanie wytrąconych globulin i ewentualnych innych wytrąconych substancji białkowych przez strącanie pod wpływem ciepła przeprowadza się według sposobu, opisanego w opisie patentu głównego nr 93587 przy wartości $\text{pH} = 4,4$ przez odwirowanie w strumieniu ciągłym. Oddzielone substancje białkowe zbierają się w wirnikach, i

2

albumina pozostaje w cieczy, znajdującej się na wierzchu.

Wadą znanej metody oddzielania jest to, że stosunkowo dużo albuminy pozostaje w oddzielnym koncentracie, tak że potrzebne są jeszcze liczne procesy przemywania i wirowania dla uzyskania cennej albuminy resztkowej. Oprócz tego wirowanie jest bardzo czaso- i pracochłonne, i stwarza wiele hałasu. Pomimo tych wad nie brano pod uwagę innej metody pracy, ponieważ w praktyce od wielu lat metodzie Cohn'a przyjęte i potrzebne jest rozdzielanie zawiesiny, składającej się z wytrąconych globulin i rozpuszczonej albuminy, przez odwirowanie. Doświadczenia wykazały, że zawiesiny według metody Cohn'a praktycznie przy normalnych wymaganiach nie dają się filtrować.

Zbadano różne metody sączenia, aby usunąć strącone proteiny, otrzymane przy zimnym frakcjonowaniu etanolem. Sączenie utrudniała szczególnie konsystencja substancji. Stwierdzono, że globuliny, które otrzymano przy strącaniu etanolem pod wpływem ciepła, różnią się znacznie od tych, które otrzymano przy strącaniu na zimno.

Nieoczekiwanie stwierdzono, że można oddzielić z zawiesiny przy znacznie mniejszym nakładzie substancje białkowe, wytrącone pod wpływem ciepła, jeśli oddzielanie przeprowadza się przez sączenie spławiakowe zawiesiny.

Według wynalazku sposób wydzielania albuminy z krwi, produktów krwi, innych cieczy ustrojowych i ekstraktów tkankowych poprzez oddzielenie plazmy od stałych składników krwi, komórek krwi i płytek krwi, ewentualne odzyskanie rozpuszczalnych składników nie-albuminowo-plazmowych z plazmy, wytrącenie i oddzielenie globulin, wzbogacenie albuminy, korzystnie przez wytrącenie i oddzielenie, w którym wytrącenie globulin prowadzi się przez ogrzewanie oddzielonej cieczy w temperaturze 60–75°C w obecności alkoholu o wzorze $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{OH}$, w którym $n = 0,1$ lub 2 i substancji stabilizujących albuminy, po czym wytrącone globuliny oddziela się według patentu nr 93587, polega na tym, że globuliny oddziela się na drodze sączenia spławiakowego zawieszin na elemencie filtra siatkowego o wielkości oczek 20–200 μ , po czym tak otrzymany klarowny roztwór, zawierający albuminy poddaje się ewentualnie sączeniu przez przepięcie do dializy.

Sączenie spławiakowe jest znane. Sączenie spławiakowe przeprowadza się zwykle w odśrodkowych filtrach oczyszczających, które w zasadzie składają się z zamkniętego autoklawu, w którym na ustawionym w osi bieżącym wale drążonym umieszczone są okrągłe elementy filtra, które albo są umieszczone poziomo, albo pionowo równolegle względem siebie. Elementy filtra są zwykle wyposażone w tresę z siatki metalowej.

Sączoną substancję traktuje się pomocniczymi środkami do sączenia, zwykle ziemią okrzemkową, którą miesza się w dawkach zależnych od rodzaju zmełnienia i charakteru pozostałości.

Przesącz, zbierający się na elementach filtra, spłukuje się przez wirowanie elementów filtra i płukanie w przeciwnym kierunku. Pozostałości są wynoszone jako tak zwane Slurry (szlam).

Sączenie spławiakowe ma nieoczekiwane zalety w porównaniu z innymi metodami sączenia. Oprócz sączenia spławiakowego zbadano następujące metody sączenia: sączenie klarujące za pomocą filtrów tarczowych węglowych i azbestowych, warstwy filtrów oparte na celulozie, filtry z włókna szklanego, szkło spiekane. Zastosowane metody sączenia prowadziły albo do nadmiernie długich czasów sączenia, zatykania wkładek filtra, albo zbyt mętnych przesączonych cieczy. Zastosowanie filtra spławiakowego umożliwia uniknięcie długiego czasu sączenia, otrzymanie klarownych przesączów, które nie wymagają dodatkowych filtracji klarujących, tak że możliwe jest optymalne przeprowadzenie procesu uzyskiwania albuminy.

W szczególności proponuje się sączenie w odśrodkowym filtrze oczyszczającym z zamkniętym autoklawem i o wielkości oczka elementów filtra 20–200 μ .

W szczególności dla niniejszych cieczy stosuje się wielkość oczka 70–90 μ . Przy tej wielkości oczka uzyskuje się optimum między osiągalnym przerobem i całkowitym przesączaniem, przy czym każdorazowo trzeba przeprowadzić tylko jeden etap sączenia.

W celu wystarczającego przygotowania powierzchni filtra do następującego sączenia korzystne jest w niektórych przypadkach najpierw przeprowadze-

nie pierwotnego namulenia za pomocą cieczy obojętnej, w którym element filtra zostaje obłożony warstwą o grubości około 0,5 cm pomocniczego środka do sączenia. Jako pomocnicze środki do sączenia stosuje się zwykle handlowe ziemie okrzemkowe o oznaczeniach znaków towarowych Hyflo-Super-Cel, Celite 545 albo Perlite. Oprócz tego można również stosować znane celulozowe pomocnicze środki do sączenia, jednakże o mniej dobrym działaniu filtrującym. Za ich pomocą można również uzyskać dla wielu przypadków wystarczający produkt. Zalecane jest wstępne spęcznie pomocniczego środka do sączenia.

Korzystne wyniki sączenia uzyskuje się za pomocą umieszczonego poziomo elementu filtra, zaopatrzonego w tresę z siatki metalowej o wielkości oczek 80 μ .

Korzystnie przy zawartości w zawieszinie około 4–6% białka plazmatycznego zadaje się zawieszinę pomocniczym środkiem filtracyjnym z ziemi okrzemkowej w ilości około 20–70 g na litr. Tę zawieszinę następnie sączy się. Niższe stężenia białka pociągają za sobą ewentualnie również mniejsze ilości pomocniczego środka filtracyjnego.

W celu odzyskania także albuminy, znajdującej się w objętości osadu tacowego (Slurry), można szlam przepuścić również przez urządzenie do sączenia objętości resztkowej o małej części całkowitej powierzchni filtra, po przeprowadzeniu oczyszczenia przez wirowanie i płukanie w przeciwnym kierunku albo klarowania w procesie obiegowym objętości aparatu filtracyjnego. W celu zwiększenia wydajności można stosować bez straty zdolności sączenia ciśnienia $4,0 \pm 2,5$ barów.

Wynalazek wyjaśniają następujące przykłady. W obydwu przykładach zastosowano dwie różne zawiesziny. W przykładzie I zastosowano zawieszinę, którą uzyskano za pomocą sposobu według opisu patentu głównego nr 93587.

Przykład I. Z krwi ludzkiej oddziela się składniki stałe (komórki krwi i płytki krwi) i odciąga się czynniki krzepnięcia. Roztwór wyjściowy zawiera około 5–6% białka plazmatycznego. Według sposobu, przedstawionego w opisie patentu głównego 93587, usuwa się czynnik krzepnięcia VIII i fibrynogen przez sedymentację krio-etanolową. Kompleks protrombiny usuwa się przez absorpcję. Pierwotna plazma jest HBAg-ujemna, ma normalne wartości transaminazy i nie zawiera widocznej hemoglobiny. Do pierwotnej plazmy dodaje się kaprylan sodu, dotąd aż uzyska się stężenie 0,004 mola. Mieszaninę, która zawiera około 9% etanolu, ogrzewa się przy wartości pH = 6,5. Wartość pH osiąga się za pomocą 0,5 n HCl. Temperaturę doprowadza się w ciągu około 3 godzin przy równomiernym dopływie ciepła do 68°C. Następnie ciecz oziębia się do temperatury 10°C. W oziębionym za pomocą płaszcza zewnętrznego odśrodkowym filtrze do oczyszczania poddaje się zawieszinę dalszej przeróbce w temperaturze 10°C. Roztwór, przechodzący do dalszej przeróbki, zawiera około 2–2,5% albuminy.

Na rysunku przedstawiono schematycznie, jak przerabia się roztwór wyjściowy. Centralny przyrząd całego urządzenia stanowi kocioł filtracyjny

12 o podwójnych ścianach, tak że za jego pomocą można zarówno ogrzewać, jak również oziębiać. Kocioł ma pojemność około 220 litrów i powierzchnię filtracyjną około 3 m². Okrągłe elementy filtra (tarcze filtracyjne) 14 są połączone z centralnym, zdolnym do wirowania wałem drążonym 13, w ten sposób, że przesącz po przejściu przez powierzchnię filtracyjną i środowisko filtracyjne, które pokrywa każdy element filtra, wpływa do środkowej kolumny i następnie zostaje tam odessany i przez przewód 15 i zawór przepływu klarownego 7 zostaje wyniesiony do odstojnika. Elementy filtra są pokryte trefą z siatki metalowej. Elementy filtra stanowią w zasadzie wydrążone bidło, które jest połączone z wałem drążonym 13. Pomocniczy środek filtracyjny i wytrącone globuliny zostają usunięte z elementów filtra między cyklami filtracyjnymi przez odwirowanie odśrodkowe i przemyte dodatkowo za pomocą 1% roztworu NaCl, tak że filtr jest następnie ponownie przygotowany do następnego cyklu.

Nieprzesączony roztwór wyjściowy utrzymuje się w zbiorniku zmętniającym 16 przy ciągłym mieszaniu za pomocą mieszadła 3 w stanie zawiesiny. Za pomocą pompy 2 wprowadza się substancję wyjściową przez zmętniający zawór dopływu zawiesiny 9, przez dwa zawory wlotowe 10, 11 do kotła filtracyjnego 12. Kocioł można zasilać powietrzem sprężonym przez zawór sprężonego powietrza 5.

Najpierw zasila się elementy filtra przeprowadzonym w zawiesinę w wodzie destylowanej pomocniczym środkiem filtracyjnym w postaci zawiesiny 1 kg Celite 545 (znak towarowy dla pomocniczego środka filtracyjnego z ziemi okrzemkowej) w 500 litrach wody z pierwotnym nanoszeniem o grubości około 0,2 cm pod ciśnieniem atmosferycznym. Następnie 500 litrów zawiesiny, zawierającej albuminę, zadaje się 25 kg Celite 545 i poddaje wymieszaniu. Mieszanie wprowadza się ze zbiornika zawiesiny do kotła filtracyjnego i pod ciśnieniem 2 barów przetłacza się przez powierzchnie filtracyjne elementów 14. Przed właściwym zlanie przesączonej cieczy do zbiornika klarującego przesyła się w tak zwanym procesie obiegowym (zawór obiegu 6, pompa 2) stale na nowo substancję przez elementy filtra, dotąd aż we wzorniku 17 pojawi się przesącz wystarczająco klarowny. Następnie przesącz wylewa się przez zawór 7 do zbiornika klarującego.

Skoro tylko oczyszczony, zawierający albuminy roztwór opuści filtr, pompuje się jednocześnie przez filtr 1%-wy wodny roztwór soli kuchennej. Ilość tego roztworu jest w przybliżeniu równa objętości połowy ilości wsadowej.

Szybkość przepływu wynosi około 150 litrów na godzinę. Stężenie proteiny w przesączu na początku procesu wynosi około 2,5%, podczas gdy stężenie końcowe wynosi w przybliżeniu 0,05%. Otrzymany roztwór jest klarowny przy stężeniu proteiny w przybliżeniu 1,5% albuminy i współczynnika osmotycznego około 1000 mosm.

Klarowny przesącz poddaje się następnie dialeczeniu z zastosowaniem systemu kasetowego

Millipore Pellicon (powierzchnia filtra około 0,9 m², producent: Millipore GmbH Neu-Isenburg, BFN) aż do osiągnięcia współczynnika osmotycznego 100–200 mosm. Szybkość zmian przepływu na początku procesu wynosi około 5–6 litrów przesączu na minutę. Dialeczenie stanowi sączenie przez przeponę do dializy.

Oczyszczanie filtra przeprowadza się przez wirowanie elementów filtra za pomocą silnika napędowego 1 i wynoszenie szlamu (Slurry) przez zawór wyladowczy 8. Przez zawór 4 można wyladowaną substancję ponownie przeprowadzić w zawiesinę i przesaczyć.

Ciecz już po przejściu przez pierwszy filtr nie wykazuje więcej efektu Tyndall'a i ma klarowność wody. Ciecz nie zawiera praktycznie substancji towarzyszących, takich jak lipidy albo obce białka. Można ją również doprowadzić bezpośrednio do wzbogacania albuminy i do opisanego następującego procesu filtracyjnego. Wzbogacanie albuminy jest znane i opisane w opisie patentu głównego nr 93587.

W zasadzie przeprowadza się ogółem następujące etapy:

Plazma, 600 kg

zawiera: 33,6 kg proteiny, z tego 18,48 kg albuminy (= 55%).

1. +9% etanolu

+0,004 M kaprylanu sodu

+HCl (do pH = 6,5)

2. Strącanie w podwyższonej temperaturze:

30 minut, 68°C

3. +HCl (pH = 4,4)

4. Sączenie spławiakowe

Roztwór albuminy o zawartości 17,2 kg albuminy (stopień skuteczności 93%).

Przykład II. Z ekstraktu łożyska usuwa się najpierw obecną hemoglobinę za pomocą rozpuszczalników, takich jak np. kwas trójchlorooctowy, chloroform, eter dwuetylowy. Następnie zawierającą białko pozostałość ogrzewa się przy wartości pH = 6,5 do temperatury 68°C. Po oziębieniu i ustaleniu wartości pH = 4,4 przez dodanie 0,5 n HCl dodaje się do 100 litrów otrzymanej cieczy 3 kg pomocniczego środka filtracyjnego i poddaje wymieszaniu (pomocniczy środek filtracyjny: Hyflo-Super-Cel; znak towarowy dla pomocniczego środka filtracyjnego z ziemi okrzemkowej).

W temperaturze 18°C i pod ciśnieniem 4 barów przetłacza się ciecz przez opisany już filtr z pomocniczą warstwą filtracyjną o wielkości oczka 70 μ. Proces prowadzi się zatem bez pierwotnego namulania. Ciecz prowadzi się w obiegu tak długo, aż we wzorniku wykaże ona klarowność wody i brak efektu Tyndall'a. Następnie w znany sposób doprowadza się albuminę, znajdującą się w cieczy, dożądanego stężenia.

Po przerobieniu całej cieczy objętość osadu taczowego, znajdującą się w filtrze z pomocniczą warstwą filtracyjną, przemywa się dodatkowo za pomocą wody destylowanej albo 0,9%-wego roztworu NaCl. Również ciecz, uzyskana przy tym, ma klarowność wody i zawiera jeszcze około 0,5–20% albuminy. Można ją również doprowadzić bezpo-

średnio do stężenia albuminy, jak to jest np. opisane w opisie patentu głównego nr 93587.

Sączenie spławiakowe można przeprowadzać zarówno z pierwotnym namulaniem, jak również bez niego. Oczyszczanie elementów filtracyjnych przeprowadza się przez wirowanie i płukanie przeciwpądowe, przy czym elementy filtracyjne wprowadza się w ruch obrotowy i pozostałości są wynoszone jako Slurry.

Przez zastosowanie dostatecznej ilości cieczy przemylającej (woda destylowana albo roztwór NaCl), podczas prowadzenia procesu przemylania dotąd, aż zostanie uzyskana praktycznie całkowita ilość albuminy, można uzyskać zwiększenie wydajności do około 96% wprowadzonej ilości albuminy. Tworzeniu się osadu tacowego, otrzymywanego w innych procesach separacji, jak np. technika wirowania, w szczególności przy wymywaniu po raz pierwszy oddzielonych substancji białkowych, w wyniku zmiany stosunku gęstości rozpuszczalnika do gęstości substancji stałej i maksymalnego mechanicznego rozdrobnienia, zapobiega się przez sączenie objętości resztkowej, po przeprowadzeniu albo oczyszczenia przez wirowanie i płukanie w przeciwpądzie, albo klarowania objętości aparatu filtracyjnego w procesie obiegowym. Z powodu praktycznie 100%-wej czystości albuminy można zrezygnować z sączenia przed dalszą przeróbką różnicznego roztworu albuminy.

Oddzielanie substancji stałych jest niezależne od temperatury. Szybkość sączenia zmienia się ze wzrostem albo spadkiem temperatury tylko nieznacznie i może być pominięta. Zwykle zakwaszoną do $\text{pH} = 4,4$, poddaną obróbce cieplnej plazmę doprowadza się do oddzielania w temperaturze pokojowej w odśrodkowym filtrze oczyszczającym, oziębianym za pomocą płaszcza zewnętrznego. Proces sączenia można również przeprowadzić w innej temperaturze. Doświadczenia wykazały, że zakres temperatur 4° do $+40^{\circ}\text{C}$ można stosować jako zakres roboczy. Ciśnienie filtracyjne można po prawie bezciśnieniowo przebiegającym pierwotnym namulaniu zwiększyć do $4,0 \pm 2,5$ barów. Wynikająca stąd sprawność sączenia wynosi około 150 litrów przesączu m^3/h . Jako pomocnicze środki filtracyjne nadają się szczególnie ziemie okrzemkowe, jak podano na wstępie.

Ilości wymienione w przykładach są zmienne w zależności od ilości oprawy filtra. Przeprowadzono zarówno próby w małych objętościach (około 10 litrów), jak również w dużych zbiornikach (około 500 litrów) z dobrym wynikiem.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wydzielania albuminy z krwi, produktów krwi, innych cieczy ustrojowych i ekstraktów tkankowych poprzez oddzielenie plazmy od stałych składników krwi, komórek krwi i płytek krwi, ewentualne odzyskanie rozpuszczonych składników nie-albuminowo-plazmowych z plazmy, wytrącenie i oddzielenie globulin, wzbogacenie albuminy, korzystnie przez wytrącenie i oddzielenie, polegający na tym, że wytrącenie globulin prowadzi się przez ogrzewanie oddzielonej cieczy w temperaturze $60-75^{\circ}\text{C}$ w obecności alkoholi o wzorze $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{OH}$, w którym $n = 0,1$ lub 2 i substancji stabilizujących albuminy, po czym wytrącone globuliny oddziela się według patentu głównego nr 93587, **znamienny tym**, że globuliny oddziela się na drodze sączenia spławiakowego zawieszin na elemencie filtra siatkowego o wielkości oczek $20-200\mu$, po czym tak otrzymany klarowny roztwór, zawierający albuminy, poddaje się ewentualnie sączeniu przez przeponę do dializy.

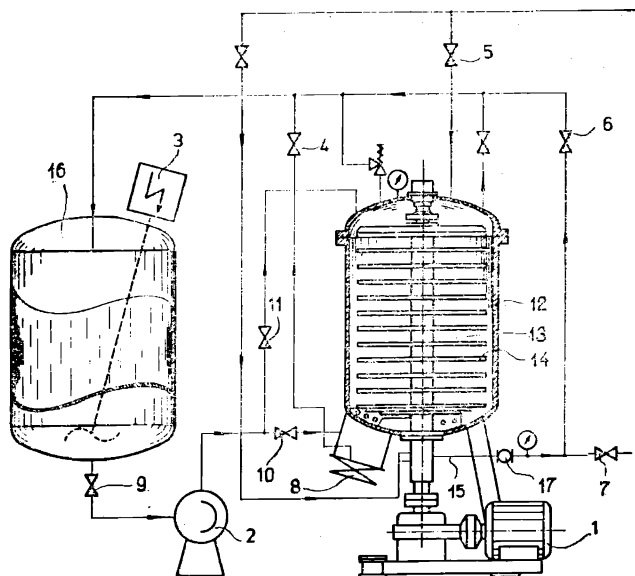
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się filtr o wielkości oczek elementów filtra, wynoszącej $70-90\mu$.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że sączenie przeprowadza się przez umieszczone poziomo elementy filtra, zawierające tresę z siatki metalowej o wielkości oczka 80μ .

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zawieszinę o zawartości około 4-6% białka plazmatycznego zadaje się około 30-70 g pomocniczego środka do sączenia z ziemi okrzemkowej na litr.

5. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że stosuje się celulozowy środek pomocniczy do sączenia w stanie uprzednio spiecznionym.

6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces sączenia przeprowadza się przy nadciśnieniu, wynoszącym $4,0 \pm 2,5$ barów.



CZYTELNI
Urzędu Patentowego
Pracowni BZ