

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

OPIS PATENTOWY

50094

**Patent dodatkowy
do patentu**

Zgłoszono: 20.IV.1963 (P 101 349)

Pierwszeństwo: 18.XII.1962 Niemiecka
Republika
Demokratyczna

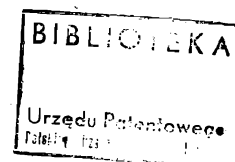
Opublikowano: 12.X.1965

Kl. 30h, 2/04

MKP A 61 k

17/18

UKD



Współtwórcy wynalazku: prof. dr Fritz Markwardt, dr Peter Walsmann,
dr Gerhardt Schäfer, Horst Töpfer

Właściciel patentu: VEB Arzneimittelwerk Dresden, Radebeul (Niemiec-
ka Republika Demokratyczna)

Sposób wyodrębniania hirudyny z pijawek lekarskich

1
Przedmiotem wynalazku jest sposób wyodrębniania zawartego w pijawkach lekarskich inhibitora krzepnięcia krwi — hirudyny. Wiadomo, że pijawki lekarskie, *Hirudo medicinalis* zawierają inhibitor, który łącząc się z enzymem krzepliwości krwi trombiną w określony, praktycznie niedysocjujący kompleks zapobiega krzepnięciu krwi. Na temat hirudyny ukazały się liczne opracowania w literaturze chemicznej i fizjologicznej. Zawarte tam wiadomości mają jednak tylko charakter orientacyjny. Jej chemiczno-fizyczne właściwości pozostawały nieznane, gdyż nie otrzymano hirudyny w postaci czystej. Po raz pierwszy w r. 1957 F. Markwardt poinformował o udanym wyodrębnieniu hirudyny, która, jak się okazało, jest niskocząsteczkowym polipeptydem.

Według znanego sposobu otrzymuje się surową hirudynę przez ekstrakcję mieszaniną woda — aceton odwodnionych za pomocą absolutnego etanolu głów pijawek i frakcjonowane wytrącanie acetonem. Surowy produkt oczyszcza się stosując elektrodializę ekstrakcję propanolem i elektroforezę bibułową. Choć sposób ten prowadzi do elektroferetycznie jednorodnej hirudyny, to jednak nie nadaje się do otrzymywania hirudyny na dużą skalę, gdyż zwłaszcza etap elektroforezy z wymywaniem uprzednio zamaskowanej i wyciętej strefy zawierającej hirudynę stwarzają bardzo poważne trudności. Przy stosowaniu tego sposobu należy uwzględnić niską wydajność, która nie

2
przekracza 25% hirudyny znajdującej się w pijawkach. Ze względów ekonomicznych sposób ten nie nadaje się do stosowania.

W następującej tabeli (I) przedstawione są: przebieg wyodrębniania, aktywność właściwa poszczególnych frakcji i występujące straty.

Tabela I

Otrzymywanie hirudyny według Markwardt'a

Sposób wyodrębniania hirudyny z głów pijawek Fazy procesu	Sucha masa g	Całkowita aktywność ATE*)	Właściwa aktywność ATE*/mg	% strat
Odwodnienie 10,000 głów pijawek w absolutnym etanolu i rozdrobnienie	375,0	4875	13	—
Ekstrakcja 40% acetonem frakcjonowane strącanie	4,40	3108	700	36,1
Elektrodializa strącanie acetonem	2,39	2868	1200	41,0
Ekstrakcja propanolem liofilizacja	0,94	2350	2500	51,8
Elektroforeza bibułow liofilizacja	0,135	1147	8500	76,5

*) Jednostki antytrombiny

Stwierdzono, że występujące w pierwszych fazach procesu wysokie straty aktywności mogą być ograniczone jeżeli oddzielanie produktów ubocznych przeprowadzać za pomocą bardzo rozcieńczonego, a następnie wytrącanie surowej hirudyny za pomocą stężonego rozpuszczalnika stosowanego do ekstrakcji.

Wytrącanie zanieczyszczeń z przygotowanego w znany sposób ekstraktu 40%-owej mieszaniny aceton — woda następuje po rozcieńczeniu $\frac{1}{2}$ objętością 80%-owej mieszaniny aceton-woda, przez dodanie lodowatego kwasu octowego i ustalenie w ten sposób wartości pH = 4–5, korzystnie 4,3–4,5.

Po odsączeniu osadu roztwór zawierający produkt doprowadza się do wartości pH = 6–7 i zateża w próżni w temperaturze nie przekraczającej 40° do jednej dziesiątej objętości. Koncentrat zadaje się 10%-owym kwasem tróchlorooctowym w acetonie w objętości równej 60% objętości koncentratu, przy czym wartość pH ustala się do wartości 1,5–2,5, korzystnie 1,8. Z tego roztworu wytrąca się surową hirudynę przez dodanie 15-krotnej ilości acetonu ochłodzonego do –10°C (w przeliczeniu na objętość zateżonego roztworu). Wydajności hirudyny podnoszą się przez to do 90%.

Dalej stwierdzono, że możliwe jest wzbogacenie surowej hirudyny o aktywności około 500 ATE/mg przez wielokrotne jej wytrącanie ochłodzonym do temperatury 0–5°C, mieszającym się z wodą rozpuszczalnikiem, korzystnie etanolem, przy czym oddziela się nieaktywne substancje uboczne. Aktywność właściwa otrzymanego produktu przejściowego sięga około 1300 ATE/mg. Wydajności procesu wzbogacenia sięgają 90% dodanej surowej hirudyny.

Sposobem według wynalazku możliwe jest również oddzielanie barwnych i niskocząsteczkowych zanieczyszczeń, które stale towarzyszą hirudynie przez adsorpcję ich na oksycelulozie. W tym celu wytrąconą hirudynę rozpuszcza się w roztworze buforowym octanu amonu o wartości pH = 4–5, korzystnie 4,6, po czym miesza się z oksycelulozą. Użytkowaną mieszaninę sączy się. Ostatnie oczyszczanie hirudyny wstępnie oczyszczonej przez adsorpcję przeprowadza się za pomocą słabo kwaśnego wymiennicza jonowego z żywicy sztucznej, zwłaszcza Wofatytu CP lub amberlitu IRC — 50, którymi zadaje się przesącz otrzymany po procesie adsorpcji. Z wymiennicza jonowego eluuje się hirudynę roztworem octanu amonu przy wartości pH 7–8, a po zateżeniu w próżni w temperaturze 20–30°C wytrąca się hirudynę 10-krotną objętością 75%-owego etanolu oziębionego poniżej 0°, korzystnie –10°C. Otrzymuje się dobrze oczyszczony produkt o aktywności właściwej około 4500 ATE/mg. Wydajność wynosi 80% w przeliczeniu na dodaną surową hirudynę.

Stosując sposób według wynalazku można otrzymać hirudynę z pijawek z wydajnością około 72% i aktywności właściwej około 4500 ATE/mg.

Etapy otrzymywania hirudyny sposobem według wynalazku; aktywność właściwa frakcji pośred-

nich jak i występujące straty są podane w tabeli II.

Tabela II

Sposób wyodrębniania hirudyny z głów pijawek Fazy procesu	Sucha masa g	Całkowita aktywność ATE	Właściwa aktywność ATE/mg	% roztwór
Odwodnienie 10,000 głów pijawek w absolutnym etanolu i rozdrobnieniu	380,0	500	13	—
Ekstrakcja 40% acetonem wytrącenie zanieczyszczeń wytrącenie acetonem	9,00	450	500	10
Rozpuszczanie surowej hirudyny. Frakcjonowane wytrącanie etanolem	3,12	405	1300	19
Adsorpcja pigmentów na oksycelulozie, adsorpcja substancji czynnej na wymienniku jonowym, eluacja, liofilizacja	0,80	360	4500	28

Przykład I. a) Wydzielanie surowej hirudyny.

Spreparowane głowy 10,000 pijawek odwadnia się bezwodnym etanolem, suszy i rozdrabnia, po czym ekstrahuje się 10-krotną, następnie 5-krotną ilością 40% mieszaniny aceton — woda w temperaturze 40°C przez 30 minut.

W celu wytrącania zanieczyszczeń połączone ekstrakty rozcieńcza się 80% mieszaniną aceton — woda w ilości $\frac{1}{2}$ objętości ekstraktu. Przez dodanie lodowatego kwasu octowego ustala się wartość pH z 4,3–4,5. Utworzony osad odsąca się i odrzuca. Roztwór zawierający produkt doprowadza się do pH = 6 przez dodanie rozcieńczonego amoniaku i zateża w próżni w temperaturze nieprzekraczającej 40°C do jednej dziesiątej objętości. Koncentrat zadaje się 10%-owym kwasem tróchlorooctowym w acetonie, w objętości równej 60% objętości koncentratu doprowadzając do wartości 1,8. Z tego roztworu wytrąca się surową hirudynę przez dodanie 15-krotnej ilości acetonu ochłodzonego do –10°C (w przeliczeniu na objętość zateżonego roztworu) następnie odwirowuje i przemywa do sucha w próbkach umieszczonych w wirówce czystym, lodowato zimnym acetonem. Produkt dosusza się w eksykatorze próżniowym.

Wydajność 9,0 g surowej hirudyny.

Aktywność właściwa około 500 ATE.

b) Oczyszczanie surowej hirudyny.

9 g surowej hirudyny rozpuszcza się w 300 ml lodowatej wody destylowanej. W temperaturze 0°–5°C dodaje się bardzo wolno 540 ml etanolu (96%). Mieszaninę pozostawia się na 30 minut w tej temperaturze i bezpośrednio po tym odwi-

rowuje. Przesączony roztwór zawiera większą część hirudyny, osad zawiera wysokocząsteczkowe produkty balastowe w tym około 30% zaadsorbowanej hirudyny. Z tego powodu osad jak wyżej rozpuszcza się w 300 ml lodowatej wody destylowanej i jak wyżej wytrąca 540 ml etanolu.

Taki sam sposób postępowania z wytrąconym osadem przeprowadza się po raz trzeci. Pozostałość odrzuca się a roztwór ekstrakcyjny łączy z pierwszym przesączem.

W celu wytrącenia produktu zebrany ekstrakt oziębia się do temperatury 0—5°C. Następnie bardzo wolno dodaje się oziębionego do —10°C etanolu, aż do osiągnięcia 85% objętościowego stężenia. Przy tym dodaje się do etanolu 0,5% octanu amonu dla ułatwienia wytrącania produktu. Utworzony osad po opadnięciu odwirowuje się i po przemyciu etanolem suszy w eksykatorze próżniowym.

Wydajność: 3,12 g hirudyny.

Aktywność właściwa: 1300 ATE/mg.

3,12 g hirudyny o aktywności 1300 ATE/mg rozpuszcza się w 900 ml 0,01 M buforu octanu amonu o wartości pH = 4,6. Do roztworu dodaje się 90 g drobno rozdrobnionej oksycelulozy (zawartość grup karboksylowych około 12%) i miesza w temperaturze pokojowej około 10 godzin, następnie sączy przez filtr ze szkła porowatego i przemycia oksycelulozę na filtrze 3-krotnie 650 ml wody destylowanej. Wodę z przemycania łączy się z przesączem.

Zaadsorbowaną częściowo na oksycelulozie hirudynę ługuje się buforowym 0,05 M roztworem octanu amonu o pH = 4,6 aż do osiągnięcia pH = 4,5. Również ten roztwór z eluacji łączy się z przesączem.

Do roztworu zawierającego hirudynę dodaje się 800 ml Wofatytu CP w formie wodorowej i miesza przez noc. Podczas tego procesu wartość pH spada z 4,2 do około 3,8. Po zakończonej adsorpcji (sprawdzenie roztworu) żywicę odsącza się na filtrze ze szkła porowatego i przemycia 3-krotnie po 900 ml wody destylowanej. Wodę z przemycania i przesącz odrzuca się.

Zywicę zawiesza się w 450 ml 1 M roztworu octanu amonu i dodaje kroplami podczas mieszania 5%-owy amoniak aż do osiągnięcia wartości pH = 7,0. Suspensję sączy się przez filtr G 4 i odsącza. Żywicę ponownie zawiesza się w 450 ml roztworu octanu amonu i przez powolne wkraplanie 5%-owego amoniaku ustala wartość pH = 8,0, po czym odsącza na filtrze G 4 z porowatego szkła i przemycia wodą destylowaną. Roztwory z eluacji i wodę z przemycania łączy się i zatęża w próżni w temperaturze 20—30°C do objętości 400—450 ml.

Hirudynę wytrąca się z zatężonego roztworu 10-krotną objętością oziębionego do —10°C 95%-owego etanolu z dodatkiem 20 g octanu amonu (rozpuszcza w małej ilości etanolu). Mieszaninę odstawia się na kilka godzin do lodówki po czym odwirowuje się czystą hirudynę, którą następnie przemycia i podsusza w próbkach umieszczonych w wirówkach i suszy w eksykatorze próżniowym.

Wydajność: 0,8 g czystej hirudyny.

Aktywność właściwa: około 4500 ATE/mg.

Przykład II. Spreparowane głowy z 10,000 pijawek ekstrahuje się według przepisu z przykładu I. Do wytrącania surowej hirudyny stosuje się etanol, stosując stężenia jak w przykładzie I. Dalszy tok pracy odpowiada przykładowi I z różnicą, że jako słabo kwaśny wymiennik jonowy stosuje się amberlit TRC-50.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wyodrębniania hirudyny z pijawek lecarskich przez ekstrakcję 40%-owym wodnym roztworem acetonu odwodnionych absolutnym etanolem głów pijawek, **znamienny tym**, że ekstrakt acetonowy rozcieńcza się 80%-ową mieszaniną aceton-woda w ilości połowy objętości ekstraktu i przy wartości pH = 4—5 korzystnie 4,3—4,5 wytrąca się produkty uboczne zawierające białko, a następnie po zobojętnieniu do wartości pH = 6—7 roztwór ekstrakcyjny zatęża się do jednej dziesiątej objętości a następnie po zakwaszeniu do pH = 1,5—2,5 korzystnie 1,8 wytrąca się surowy produkt przez podwyższenie stężenia acetonem do co najmniej 80% i otrzymany surowy produkt oczyszcza przez wielokrotne wytrącanie mieszającą się z wodą organicznym rozpuszczalnikiem, korzystnie etanolem, przeprowadza w roztwór, który oczyszcza się przez traktowanie oksycelulozą i następnie słabo kwaśnym kationitem z żywicy sztucznej, po czym z oczyszczonego roztworu wytrąca etanolem hirudynę.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że hirudynę wytrąconą mieszającą się z wodą organicznym rozpuszczalnikiem rozpuszcza się w roztworze buforowym octanu amonu o wartości pH = 4—5, korzystnie 4,6, po czym miesza się z oksycelulozą, sączy, przesącz traktuje Wofatytem CP lub Amberlitem IRC-50, z których hirudynę eluuje się roztworem octanu amonu przy wartości pH = 7—8, po czym po zatężeniu w próżni w temperaturze 20—30°C wytrąca oczyszczoną hirudynę 10-krotną objętością 75%-owego etanolu oziębionego poniżej 0°, korzystnie —10°C.