

Warszawa, dnia 30 maja 1952 r.



A 61K 23/00

RZECZYPOSPOLITEJ POLSKIEJ

OPIS PATENTOWY

Nr 34858

Kl. 30h, 2/04.

Główny Instytut Chemii Przemysłowej*)

(Warszawa, Polska)

Sposób otrzymywania hydrolizatów białka do podawania pozajelitowego

Udzielono patentu z mocą od dnia 1 czerwca 1951 r.

Hydrolizaty białkowe są powszechnie stosowanym preparatem w przypadku niedoboru białkowego, a szczególnie po operacjach w przypadkach niemożności podania białka doustnie. Zapotrzebowanie na hydrolizaty wynosi około 500 l na 10 łóżek chirurgicznych rocznie.

Głównym celem podawania tych preparatów jest odżywianie organizmu chorego. Odpowiednio przygotowane hydrolizaty są doskonale przyswajane przez organizm i wykorzystanie ich dochodzi do 90%. Wartość hydrolizatów zależy od jakościowego i ilościowego składu aminokwasów, przy czym niezbędna jest obecność aminokwasów egzogennych, a mianowicie: tryptofanu, tre-

oniny, metioniny, histydyny, fenyloalaniny, waliny, leucyny, izoleucyny, argininy i lizyny. Ważna jest również jednoczesna obecność w hydrolizacie aminokwasów endogennych, gdyż mogą być one wytwarzane przez ustrój ze zbyt małą szybkością.

Hydrolizaty zawierają 50—85% wolnych aminokwasów. Pozostałe aminokwasy związane są w niskocząłonowych peptydach i mogą być bezpośrednio zużywane do syntezy białka przy niewielkim udziale systemu enzymatycznego.

Hydrolizaty białkowe stosowane być mogą doustnie lub drogą pozajelitową. Wartość preparatu doustnego zależy jednak wyłącznie od rodzaju białka i stopnia jego hydrolizy, podczas gdy preparat pozajelitowy powinien posiadać szereg właściwości pozwalających na wprowadzenie go bezpośrednio do krwiobiegu bez szkody dla organizmu:

a) powinien być absolutnie jałowy,

*) Właściciel patentu oświadczył, że wynalazcami są: Irena Chmielewska, Konstancja Raczynska-Bojanowska, Bronisława Jurecka w Warszawie i Jerzy Manicki w Jabłonie.

b) nie może zawierać ciał pyrogennych, substancji podwyższających ciśnienie krwi i substancji alergicznych,

c) nie może zawierać znacznych ilości chloru sodu ze względu na ujemny wpływ soli na nerki,

d) nie korzystna jest obecność znacznych ilości aminokwasów dwuzasadowych, które po podaniu dożylnym wywołują wymioty,

e) stężenie jonów wodorowych w hydrolizacie powinno być zbliżone do pH krwi. Przy pH niższym od 6,5 obniżona zostaje zdolność wiązania CO_2 i naruszona zostaje rezerwa zasadowa krwi.

Hydrolizaty białkowe otrzymuje się z białek o dużej wartości biologicznej, a więc z kazeiny, krwi i mięśni.

Preparaty otrzymywane z kazeiny, posiadają szereg wad. Skład ilościowy hydrolizatu kazeiny mleka odbiega od pożądanego dla organizmu stosunku aminokwasów, białko to bowiem zawiera niewystarczającą ilość lizyny i histydyny w stosunku do innych aminokwasów, ponadto duże ilości aminokwasów dwuzasadowych szkodliwie oddziałujących przy podawaniu dożylnym. Literatura dotycząca preparatu kazeinowego podkreśla niebezpieczeństwo wprowadzenia do hydrolizatu ciał pyrogennych, zawartych w surowcu. Niekorzystna też jest konieczność stosowania przy tym bardzo znacznej dawki enzymu.

Znane sposoby otrzymywania hydrolizatów białkowych z krwi przy użyciu kwasów lub zasad albo też przy użyciu enzymów przez zastosowanie wstępnej fermentacji drożdżowej, odznaczają się poważnymi wadami. Przeprowadzenie hydrolizy za pomocą kwasów lub zasad powoduje zniszczenie pewnych aminokwasów (tryptofanu), ich racemizację oraz zwiększa zawartość soli, co przy niektórych schorzeniach dyskwalifikuje preparat. Oczyszczanie białka krwi przez fermentację drożdżową nie jest korzystne, ponieważ zwiększa możliwość zakażenia wytwarzanego preparatu, jak również ze względu na konieczność usunięcia z hydrolizatu drożdży i produktów ich metabolizmu. Także znane sposoby otrzymywania hydrolizatów o wysokim stężeniu jonów wodorowych ($\text{pH} = 4,5$) są niekorzystne, preparaty bowiem takie naruszają silnie zasadowe rezerwy krwi.

Powyższych wad unika się przez zastosowanie sposobu według wynalazku. W sposobie tym jako materiału wyjściowego używa się pełnej krwi bydlęcej, stwierdzono bowiem, że pełna krew bydlęca zawiera wszystkie aminokwasy

egzogenne potrzebne dla ustroju ludzkiego, a ich ilość bezwzględna oraz wzajemny stosunek ilościowy bardziej odpowiada wymaganiom organizmu ludzkiego aniżeli skład innych białek zwierzęcych. Poza tym zhydrolizowane białko krwinek pochodzenia hemowego w hydrolizacie pełnej krwi jest korzystne przy wyrównywaniu zaburzeń anemicznych w organizmie. Ważnym jest też fakt, że hydrolizaty białek krwi są łatwiej przyswajane przez organizm niż peptydy innych białek.

Sposobem według wynalazku skoagulowane białko oczyszcza się mechanicznie, po czym rozcieńcza się je stosunkowo niewielką, w porównaniu z dotychczas znanymi sposobami, ilością wody. Rozcieńczanie białka dużą ilością wody (3 l wody na litr krwi użytej do otrzymania białka) oraz następne zagęszczanie jest zbędne. Otrzymaną zawiesinę poddaje się hydrolizie za pomocą enzymów trzustki, np. za pomocą świeżej trzustki aktywowanej, przy czym w celu wykorzystania działania zarówno proteaz jak i peptydaz, enzymy dodaje się w 2 — 3 porcjach przy różnej wartości pH. Ponieważ świeża trzustka zawiera tłuszcze i kwasy tłuszczowe, które powinny być usunięte, ekstrakcję tych składników przeprowadza się w celu uproszczenia postępowania przez zastosowanie przy hydrolizie takich środków bakteriostatycznych, które jednocześnie są rozpuszczalnikami tłuszczu i kwasów tłuszczowych. Po zakończeniu hydrolizy, roztwór oczyszcza się chromatograficznie, przy czym stosuje się węgiel aktywowany odpowiednio przygotowany. W celu uniknięcia naruszenia zasadowych rezerw krwi hydrolizat doprowadza się do $\text{pH} = 6,7 - 6,8$.

Preparat otrzymany sposobem według wynalazku, jest przezroczystą cieczą bez zapachu, jasno żółtej barwy, o słabym smaku. Zawiera on wszystkie aminokwasy egzogenne w postaci wolnej, w ilości odpowiadającej 60 — 90% ich zawartości w białku niehydrolizowanym. Przy podaniu dożylnym w ilości 2 l dziennie nie wywołuje dreszczy, podwyższenia temperatury itd. Zależnie od ilości wody, użytej do zawieszenia skoagulowanego białka, można uzyskać bez zagęszczania preparaty zawierające 5 — 10 g substancji azotowych w 100 ml roztworu. Ilość azotu aminowego wynosi 60 — 82%. Jako przykład podano skład aminokwasów hydrolizatu, zawierającego w 100 ml cieczy, 5,1 g suchej masy, 0,13 g soli nieorganicznych (NaCl), 0,69 g azotu ogólnego (0,48 g azotu aminowego).

Jak wynika z podanej niżej tabelki, otrzymany hydrolizat jest pełnowartościowym preparatem białkowym.

A m i n o k w a s	Minimalne zapotrzebowanie dzienne w gramach według Rose'a	pożądane zapotrzebowanie dzienne w gramach według Rose'a	ilość dostarczana przez 2 l hydrolizatu, podanego dożylnie w gramach
Fenylalanina	1,10	2,2	3,6
Histydyna	—	2,2	4,0
Izoleucyna	0,70	1,4	1,6
Leucyna	1,10	2,2	12,0
Lizyna	0,80	1,6	6,0
Metionina	1,10	2,2	1,8
Treonina	0,50	1,0	4,0
Tryptofan	0,25	0,5	1,0
Walina	0,80	1,6	5,2

Przykład. Krew pobraną przy uboju poddaje się bezpośredniemu odwiłknieniu przez mechaniczne trzepanie. Najpóźniej w sześć godzin po odwiłknieniu przeprowadza się koagulację, doprowadzając do naczyń z krwią przegrzaną parą wodną aż do całkowitego zdenaturowania białka. Skoagulowane białko oczyszcza się mechanicznie za pomocą wielokrotnego przemycania wodą, po czym zawiesza się je w ilości wody, odpowiadającej 1 — 1,5 objętości użytej krwi, i poddaje w ciągu 5 — 8 dni trawieniu w temperaturze 40 — 42°C za pomocą zaktywowanych w temperaturze 0 — 5°C w ciągu 24 — 72 godzin (autoaktywacja) enzymów trzustki. Do hydrolizowania białka krwi używa się trzustki w ilości 3 — 5 g suchej masy na 1 l zawiesiny. Zamiast trzustki można też stosować pankreatynę. Enzym dodaje się w 2—3 porcjach, pierwszego, ewentualnie drugiego i trzeciego lub czwartego dnia trawienia, utrzymując w początkowym okresie hydrolizy pH = 8 — 9 przez dodawanie odpowiedniej ilości wodorotlenku sodu, ostatnią zaś porcję enzymu dodaje się przy pH = 6 — 7. Podczas hydrolizy następuje zakwaszenie własne, wskutek czego odpada konieczność stosowania dodatkowej hydrolizy słabym kwasem.

W celu uniknięcia zakażenia preparatu w czasie jego otrzymywania oraz w celu usunięcia z niego substancji tłuszczowych hydrolizę prowadzi się w obecności środków bakteriostatycznych, lżejszych od wody i nie mieszających się z nią a będących jednocześnie rozpuszczalnikami tłuszczów, np. w obecności toluenu.

Po upływie 5 — 8 dni enzym inaktywuje się, roztwór oczyszcza chromatograficznie przy użyciu węgla aktywowanego. zaktywowanego dodatkowo przez kilkakrotne wygotowanie z lekko zakwaszoną wodą i przemycie. Roztwór odbarwia się z ciemnego do jasno żółtego. Następnie doprowadza się pH hydrolizatu dokładnie do wartości 6,7 — 6,8, sterylizuje preparat, spraw-

dza go na jałowość i ewentualną obecność ciał gorączkotwórczych.

Sucha masa hydrolizatu zawiera wyłącznie substancje azotowe organiczne (produkty hydrolizy białka) oraz chlorek sodu, przy czym ilość NaCl jest utrzymana w granicach poniżej jego zawartości w krwi ludzkiej.

Preparat otrzymany sposobem według wynalazku daje dobre wyniki przy stosowaniu w terapii ludzkiej. Sposób wytwarzania jak również potrzebna aparatura są proste i tanie.

Z a s t r z e ż e n i a p a t e n t o w e

1. Sposób wytwarzania hydrolizatu białka do podawania pozajelitowego przez hydrolizę skoagulowanego białka krwi za pomocą enzymów, znamieny tym, że skoagulowane białko krwi oczyszcza się mechanicznie, rozcieńcza wodą, poddaje w ciągu 5 — 8 dni trawieniu za pomocą enzymów trzustki, przy czym enzymy dodaje się w 2 — 3 porcjach przy różnej wartości pH a hydrolizę prowadzi się w obecności środków bakteriostatycznych lżejszych od wody i nie mieszających się z nią i będących jednocześnie rozpuszczalnikami substancji tłuszczowych, po czym po zakończeniu hydrolizy hydrolizat oczyszcza się chromatograficznie za pomocą odpowiednio przygotowanego węgla aktywowanego i doprowadza końcową wartość pH hydrolizatu do wartości 6,7 — 6,8.
2. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że jako mechaniczne oczyszczanie białka skoagulowanego stosuje się wielokrotne przemycanie wodą.
3. Sposób według zastrz. 1 — 2, znamieny tym, że skoagulowane białko rozcieńcza się wodą w ilości równej 1 — 1,5 objętości krwi, użytej do otrzymania tego białka.
4. Sposób według zastrz. 1 — 3, znamieny tym, że jako enzym stosuje się trzustkę świeżą, zaktywowaną.

5. Sposób według zastrz. 4, znamienny tym, że enzymy trzustki poddaje się autoaktywacji w temperaturze $0 - 5^{\circ}\text{C}$ w ciągu $24 - 72$ godzin.
6. Sposób według zastrz. 1 — 5, znamienny tym, że przed dodaniem pierwszej porcji enzymu doprowadza się zawiesinę do wartości $\text{pH} = 8 - 9$, a ostatnią porcję enzymu dodaje się przy wartości $\text{pH} = 6 - 7$.
7. Sposób według zastrz. 1 — 6, znamienny tym, że jako środek bakteriostatyczny i rozpuszczalnik substancji tłuszczowych stosuje się toluen.
8. Sposób według zastrz. 1 — 7, znamienny tym, że węgiel aktywowany, służący do chromatograficznego oczyszczania hydrolizatu, poddaje się dodatkowej aktywacji przez kilkakrotne wygotowanie z lekko zakwaszoną wodą i przemycie.

Główny Instytut Chemii
Przemysłowej
Zastępca: Kolegium Rzeczników Patentowych