



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu nr ———

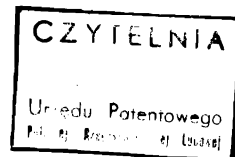
Int. Cl.³ **A61K 37/02**
C07G 7/00

Zgłoszono: 21.12.79 (P. 220595)

Pierwszeństwo ———

Zgłoszenie ogłoszono: 06.10.80

Opis patentowy opublikowano: 15.09.1984



Twórcy wynalazku: Henryk Danek, Barbara Dollar, Jan Krzek,
Zofia Lis, Jerzy Witwicki, Grażyna Zabłocka

Uprawniony z patentu tymczasowego: Wytwórnia Surowic i Szczepionek,
Kraków (Polska)

Sposób izolowania i oczyszczania Cytochromu c z ekstraktów z serc wieprzowych

Przedmiotem wynalazku jest sposób izolowania i oczyszczania Cytochromu c z ekstraktów z serc wieprzowych, w skali przemysłowej, celem otrzymania preparatu o wysokiej czystości, który może być użyty w formie leku podawanego dożylnie.

Cytochrom c jest jednym z niezbędnych składników układu cytochromowego będącego ostatnim ogniwem łańcucha utleniania komórkowych. W związku z jego funkcją biologiczną, Cytochrom c stosuje się w formie wlewów dożylnych w przypadkach, w których procesy utleniania tkankowego ulegają upośledzeniu – na przykład przy zatruciach tlenkiem węgla, gazem świetlnym i środkami nasennymi. Cytochrom c działa również skutecznie w przypadkach schorzeń kardiologicznych jak dusznica bolesna, rozedma płuc, uszkodzenia mięśnia sercowego, a także w stanach przed i pooperacyjnych zapobiegając wstrząsowi. Stwierdzono na przykład, że lek ten powodował ustąpienie bóli i duszności u chorych z niedomogą wieńcową i wadą krążenia, u których stosowanie tradycyjnej terapii nie dawało rezultatów (Gaertner H., Gurda M., Błach A., Kosiniak-Kamysz A., Janusz L., (1976), *Terapia i leki*, IV/XXVI, 300–304).

Wysokooczyszczone preparaty Cytochromu c stosowane są także szeroko w badaniach biochemicznych łańcucha oddechowego i w dydaktyce a także jako substancje wzorujące do kalibracji kolumn przy powszechnie używanej metodzie chromatografii na sitach molekularnych.

Stan techniki

Cytochrom c jest białkiem stosunkowo stabilnym. Początkowo starano się go wytrącać z ekstraktów z serc zwierzęcych za pomocą kwasu trójchlorooctowego, proces ten powodował jednak jego denaturację. Wszystkie współczesne sposoby izolowania Cytochromu c opierają się na zateżaniu i oczyszczaniu tej substancji na adsorbentach lub wymiennikach jonowych i wytrącaniu zanieczyszczeń siarczanem amonu. Jako adsorbentu używano tlenku glinu (Szczepkowski T. W., (1955), *Acta Biochimica Polon.*, 2, 169–174), a z wymienników jonowych powszechnie stosowana jest żywica polistyrenowa z grupami karboksylowymi o nazwie handlowej Amberlit IRC 50 (Brodzicki Cz., Payerchin F., (1969), *Acta Polon. Pharm.* 24, 177–179).

Żaden ze znanych sposobów nie pozwala na wyodrębnienie czystego Cytochromu c w dużej skali w prosty sposób. Tlenek glinu wymaga uciążliwego przygotowania i wykazuje małą pojem-

ność. Amberlit IRC 50 jest łatwiejszy w przygotowaniu i dlatego jest częściej używany. Stosowana dotąd adsorpcja Cytochromu c na kolumnie trwa, przy większych objętościach ekstraktu, kilkanaście lub kilkadziesiąt godzin, co jest niekorzystne zarówno z punktu widzenia zmian molekularnych Cytochromu C jak i organizacji produkcji. Przy elucji stosuje się najczęściej gradient stężenia soli, a więc metodę trudną do zastosowania w produkcji Cytochromu c w skali przemysłowej. Ponadto, wszystkie znane dotąd metody są wieloetapowe i czasochłonne, przy czym obejmują kilka długotrwałych dializ. Wyżej wymienionych niedogodności nie zawiera postępowanie według wynalazku.

Istota wynalazku polega na doborze takich procesów izolowania i oczyszczania Cytochromu c z ekstraktów z serc wieprzowych oraz ich kolejności i sposobu technicznego przeprowadzenia, które gwarantują, że Cytochrom c o wysokiej czystości otrzymuje się w wyniku zaledwie trzyetapowego postępowania technologicznego a mianowicie:

Etap 1 — I adsorpcja Cytochromu c na Amberlicie IRC 50 metodą „batch” przy pH 6,8–8,5, korzystnie 7,0 elucja jego roztworem amoniaku o stężeniu 2 mol/l — również metodą „batch” — oraz zobojętnianie eluatów kwasem solnym o stężeniu 5 mol/l.

Etap 2 — wysalanie substancji towarzyszących siarczanem amonu w ilości 600 g/l zobojętnionego eluatu oraz dializa od siarczanu amonu (do wody).

Etap 3 — II adsorpcja Cytochromu c na amberlicie IRC 50 metodą „batch” przy pH 6,8–8,5 korzystnie przy pH 7 elucja jego roztworem amoniaku o stężeniu 2 mol/l — na kolumnie, dializa od amoniaku (do wody) i zobojętnienie wydializowanych eluatów kwasem solnym.

W etapie 1 i 3, do adsorpcji Cytochromu c na Amberlicie IRC 50, a w etapie 1 także do elucji, zastosowano metodę „batch” zamiast najczęściej używanych kolumn chromatograficznych. Metoda ta polega na mieszaniu określonej ilości adsorbenta z całą objętością płynu, z którego wyadsorbrowuje się wydzielaną substancję i oddzieleniu adsorbenta od płynu po zakończeniu prowadzonego procesu. Przy elucji zalewa się adsorbent określoną objętością eluatu, miesza się przez pewien czas i w końcu oddziela od niego eluat zawierający izolowaną substancję.

Zastosowanie metody „batch” w I etapie do adsorpcji i elucji Cytochromu c z Amberlitu umożliwia przeprowadzenie tego procesu w skali przemysłowej w krótkim czasie: 6 do 8 godzin. Dodatkowo, aparaturę do elucji metodą „batch” można łatwo zhermetyzować przez co eliminuje się zagrożenie zdrowia pracowników. Dalszym istotnym elementem ciągu technologicznego według wynalazku jest wprowadzenie procesu zobojętniania amoniakalnych eluatów po I adsorpcji, przez co eliminuje się wielogodziną dializę. W stosunku do znanej metody izolowania Cytochromu c z serc wieprzowych w skali przemysłowej (Brodzicki Cz., Payerchin F., (1969), Acta Polon. Pharm. 24, 177–179), sposób według wynalazku wielokrotnie skraca czas adsorpcji w etapie 1, eliminuje dializę I eluatów amoniakalnych, eliminuje pracochłonny i trwający 3–4 dni proces adsorpcji Cytochromu c na tlenku glinu, a następnie 48 godziną dializę od amoniaku, oraz zezwala na zorganizowanie produkcji zgodnie z wymogami BHP.

Sposobem według wynalazku można izolować Cytochrom c o wysokiej czystości (kwalifikującej go do sporządzania leku do wstrzykiwań dożylnych) z ekstraktów z kilkuset kilogramów serc wieprzowych, w sposób bezpieczny dla personelu i przy zastosowaniu nieskomplikowanej aparatury produkcyjnej. Powtarzalność technologii charakteryzują dane zamieszczone w tabeli 1.

Czystość spektralną Cytochromu c określa się przez stosunek absorbancji preparatu, zredukowanego dwutlenkiem sodu, przy długości fali 550 nm (charakterystyczny szczyt pochłaniania światła przez Cytochrom c) do absorbancji preparatu, po utlenieniu żelazicyjankiem potasu, przy długości fali 280 nm charakterystycznej dla wszystkich białek zawierających aminokwasy aromatyczne. Wartość stosunku A_{550}/A_{280} najbardziej oczyszczonych cytochromów ssaków leży w granicach 1,22 do 1,26. Wszystkie preparaty przedstawione w tabeli 1 wykazują czystość, która kwalifikuje je do zastosowania w formie leku.

Przykład.

Etap 1. Z 209 kg świeżych serc wieprzowych, usunięto tłuszcz, skrzepy krwi i przerośnięte tkanki. Uzyskano 150 kg mięśnia sercowego, który zmielono w chłodni, zalano 300 l zimnej wody wodociągowej i pH zawiesiny ustawiono na 4,0 za pomocą kwasu solnego o stężeniu 2 mol/l. (Od tego momentu całą procedurę izolowania Cytochromu c przeprowadzano w temperaturze 4 do 8°C). Ekstrakcję Cytochromu c prowadzono wolno mieszając zawiesinę, przez 3 godziny po czym

pH podwyższono do 7,0 za pomocą roztworu wodorotlenku sodowego o stężeniu 2 mol/l. Części stałe oddzielono sącąc zawieszinę przez gęste płótno. Klarowny przesącz w objętości 300 l przepompowano do dwu reaktorów szklanych o pojemności roboczej 150 l i do każdego z nich dodano stałego siarczanu amonu w proporcji 0,1 kg/100 l płynu i zregenerowany Amberlit IRC 50: 10 l/100 l płynu. Mieszano przez 4 godziny z szybkością 150 obrotów na minutę a następnie dolnym spustem usunięto z reaktora Amberlit z zaadsorbowanym Cytochromem c (zabarwienie żywicy intensywnie różowo-czerwone), przemyto dokładnie wodą wodociągową i partiami przenoszono do reaktora szklanego o pojemności roboczej 25 l, zalewano w nim równą objętością roztworu amoniaku o stężeniu 2 mol/l i mieszano przez 40 minut a następnie eluaty spuszczano dolnym spustem, w układzie zhermetyzowanym. Wszystkie eluaty zawierające Cytochrom c (objętość 30 l) połączono w reaktorze szklanym i przy stałym mieszanii, doprowadzono ich pH do 7,0 za pomocą kwasu solnego o stężeniu 5 mol/l. Wytrąconego przy tym brunatnego osadu nie oddzielano, tylko przystąpiono niezwłocznie do etapu 2.

Etap 2. Do reaktora zawierającego zobojętniony eluat Cytochromu c z I adsorpcji na Amberlitie IRC 50 dodano 21 kg stałego siarczanu amonu (proporcja: 600 g siarczanu amonu na 1 l zobojętnionego eluatu), mieszano 3 godziny od momentu rozpuszczenia a następnie wytrącony osad odsączono na bibule. Klarowny przesącz dializowano w workach tofianowych do bieżącej wody wodociągowej przez 48 godzin.

Etap 3. 70 l oddializowanego płynu przepompowano do reaktora o pojemności roboczej 100 l i dodano 2,1 l zregenerowanego Amberlitu IRC 50 (3 l Amberlitu na 100 l płynu) i mieszano przez 3 godziny. Następnie Amberlit z zaadsorbowanym Cytochromem c (zabarwienie żywicy czerwono-brązowe) przeniesiono do szklanej kolumny. Elucję prowadzono za pomocą roztworu amoniaku o stężeniu 2 mol/l. Pierwsze frakcje o zabarwieniu brunatnym odrzucano, a zbierano eluujące się później frakcje o intensywnie czerwonym, krwistym zabarwieniu. Eluat (2 l) dializowano do wody destylowanej przez 48 godzin, zobojętniono roztworem kwasu solnego o stężeniu 2 mol/l i przesączono przez bibułę. Uzyskano 2,1 l roztworu Cytochromu c o stężeniu 5 mg/cm³ i czystości 1,28. Wydajność w cyklu produkcyjnym 11 g, co odpowiada wydajności 5,26 g/100 kg serc wieprzowych.

Tabela 1.

Wydajność oraz czystość spektralna Cytochromu c
izolowanego sposobem według wynalazku

Serca wieprz. (kg)	Otrzymany Cytochrom c (g)	Czystość spektralna A_{550}/A_{280}	Wydajność (g Cyt.c/100 kg serc)
192	10,0	1,14	5,21
195	13,2	1,19	6,72
131	9,0	1,05	6,87
163	8,0	1,20	4,90
286	17,0	1,03	5,94
286	15,0	1,22	5,24
209	11,0	1,28	5,26

Zastrzeżenie patentowe

Sposób izolowania i oczyszczania Cytochromu c z ekstraktów z serc wieprzowych, **znamienny tym**, że Cytochrom c adsorbuje się metodą „batch” na wymienniku jonowym Amberlit IRC 50 przy pH 6,8–8,5, korzystnie przy pH 7,0 i eluuje metodą „batch” roztworem amoniaku o stężeniu 2 mol/l, eluaty zobojętnia kwasem solnym o stężeniu 5 mol/l i dodaje stałego siarczanu amonu w ilości 600 g na każdy litr zobojętnionego eluatu, a po odsączeniu wytrąconych substancji towarzy-

szących usuwa się z roztworu siarczan amonu przez dializę do wody i z wydializowanego roztworu ponownie adsorbuje się Cytochrom c metodą „batch” na Amberlicie IRC 50 przy pH 6,8–8,5, korzystnie przy pH 7,0. eluuje na kolumnie roztworem amoniaku o stężeniu 2 mol/l i usuwa amoniak z eluatu przez dializę do wody, a w końcu roztwór po dializie neutralizuje kwasem solnym.