



Patent dodatkowy
do patentu

Zgłoszono: 06.IV.1968 (P 126 272)

Pierwszeństwo:

Opublikowano: 10.II.1971

Kl. 30 h, 2/04

MKP A 61 k, 17/00

UKD

Współtwórcy wynalazku: Robert Krauze, Eugenia Nowicka, Antonina Komorowska-Rycerz

Właściciel patentu: Wytwórnia Surowic i Szczepionek, Warszawa (Polska)

Sposób zatężania wodnego roztworu plazminogenu

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób zatężania roztworów plazminogenu.

Plazminogen jest białkiem plazmy krwi. Jako proenzym plazminy, enzymu trawiącego białka, zwłaszcza fibrynę, jest on ważnym składnikiem układu krzepnięcia krwi.

Czyste preparaty plazminogenu stosowane są w terapii przeciwzakrzepowej, jak również jako odczynniki w badaniach biologicznych i biochemicznych.

Jedna z metod otrzymywania czystego plazminogenu polega na frakcjonowaniu białek plazmy na kolumnach chromatograficznych (Wallen, 1959; Wallen, 1960). Eluaty zawierają jednak niskie stężenia plazminogenu, mieszczące się w granicach 0,02—0,08% wagowych. Dotychczas stosowane metody zatężania tych roztworów, polegające na wytrącaniu plazminogenu siarczanem amonu lub acetonem, nie pozwalają na całkowite wytrącenie białka i powodują częściową jego denaturację. W wyniku denaturacji białka na tym etapie otrzymuje się preparaty o niskiej biologicznej aktywności właściwej.

Celem wynalazku jest zastosowanie takiego środka wytrącającego, aby w określonych warunkach otrzymać całkowite wytrącenie białka, unikając jednocześnie jego denaturacji.

Od dawna znana jest metoda wytrącania białek przy pomocy jonów cynku (Cohn i inni, 1950). Nie była ona jednak dotychczas stosowana do wytrącania plazminogenu, ponieważ jony te działają inhibująco na jego aktywność biologiczną (Alkjaersig i inni, 1958). Przedmiotem wynalazku jest taki dobór warunków prowadze-

2

nia procesu, który pozwala na zastosowanie soli cynku do wytrącania plazminogenu i uzyskiwania tym sposobem jego stężonych roztworów o wysokiej aktywności fizjologicznej.

Sposobem według wynalazku, do wodnego roztworu plazminogenu, stanowiącego produkt końcowy w procesie otrzymywania plazminogenu metodą chromatografii kolumnowej, zawierającego 0,02—0,08% wagowych plazminogenu, dodaje się wodny roztwór soli cynku takiej jak siarczan lub octan. Ilość soli cynku dobiera się tak, aby jej końcowe stężenie w uzyskanym roztworze wynosiło 5—20 mM. Aby uniknąć denaturacji białka proces prowadzi się w temperaturze 0—5°C. Natychmiast po dodaniu roztworu soli cynkowej pH zawiesiny doprowadza się za pomocą wodorotlenku sodu do wartości 8—9. Wytrąconą zawiesinę pozostawia się w temperaturze 0—5° na okres 2—5 godzin celem koagulacji osadu. Osad odwirowuje się w temperaturze nie przekraczającej 5° i rozpuszcza w wodnym roztworze wersenianu sodu. Następuje przy tym rozbięcie kompleksu plazminogen — cynk z jednoczesnym wytworzeniem związku kompleksowego cynku.

Ilość wersenianu użyta do rozpuszczenia osadu powinna odpowiadać stechiometrycznie ilości soli cynku użytej do wytrącenia plazminogenu, przy czym korzystnie stosuje się roztwór wersenianu o stężeniu molowym 0,5 M.

Rozpuszczanie osadu prowadzi się pod kontrolą pH-metru, nastawiając pH przy pomocy kwasu solnego lub ługu na wartość 9. Uzyskany roztwór poddaje się diali-

zie, prowadzonej w temperaturze 0—5°C wobec zbuforowanego roztworu soli fizjologicznej o wartości pH=8—10.

Podczas dializy następuje usunięcie z roztworu związków kompleksowych cynku.

W wyniku powyższego procesu otrzymuje się roztwór plazminogenu o stężeniu białka 1—2% wagowych z wydajnością 85—95% bez obniżenia biologicznej aktywności właściwej preparatu.

Przykład I. 2.000 ml roztworu plazminogenu o stężeniu białka 0,037% wagowych i aktywności 8,7 jednostek kazeinolitycznych Remmerta w 1 ml roztworu, schłodzone do temperatury 3°C. Do roztworu wkropiono, przy ciągłym mieszaniu, 21 ml 0,5 M, schłodzonego do temperatury 3°C, roztworu wodnego siarczanu cynku. pH skorygowano 1 n ługiem sodowym do wartości 9 i zawiesinę pozostawiono w temperaturze 3°C na okres 5 godzin. Osad odwirowano na wirówce chłodzonej w temperaturze 3°C i rozpuszczono w 21 ml 0,5 M roztworu wodnego wersenianu sodu, schłodzonego również do temperatury 3°C.

Rozpuszczaniu towarzyszyło alkalizowanie roztworu, któremu przeciwdziałano dodając 1 n kwas solny w taki sposób, aby wartość pH utrzymywała się w granicach 8—10. Po rozpuszczeniu osadu wartość pH roztworu skorygowano do 9,0 i roztwór, po przeniesieniu do woreczka celofanowego, poddano dializie wobec 10

litrów soli fizjologicznej zbuforowanej amoniakiem do wartości pH=9. Po ukończeniu dializy otrzymano 52 ml roztworu o stężeniu białka 1,3% wagowych i aktywności 302 jednostek w 1 ml roztworu.

5

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób zatężania wodnego roztworu plazminogenu, stanowiącego produkt końcowy w procesie otrzymywania plazminogenu metodą chromatografii kolumnowej, na drodze wytrącania plazminogenu z roztworu, **znamienny tym**, że do roztworu plazminogenu dodaje się w temperaturze 0—5°C wodny roztwór soli cynku takiej jak siarczan lub octan, uzyskany roztwór poddaje się zalkalizowaniu do wartości pH=8—10, po czym wytrącony i odwirowany osad rozpuszcza się w wodnym roztworze wersenianu sodu przy wartości pH=9, a następnie otrzymany roztwór podaje się dializie, przy czym zostają z niego usunięte kompleksowe związki cynku.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że sól cynkową stosuje się w takiej ilości, aby jej końcowe stężenie molowe wynosiło 5—20 mM.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się roztwór wersenianu sodu o stężeniu molowym 0,5 M w ilości stechiometrycznej w stosunku do użytej soli cynku.