



Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 22.X.1963 (P 102 792)

Pierwszeństwo: _____

Opublikowano: 20.I.1967

Kl. 30 h, 2/10

MKP A 61 k 17/00

UKD

Współtwórcy wynalazku: inż. Felicjan Mozołowski, inż. Ryszard Kaflow-
ski, Stanisław Południkiewicz, Jadwiga Ważna,
Barbara Mozołowska

Właściciel patentu: Jeleniogórskie Zakłady Farmaceutyczne „Polfa”
Przedsiębiorstwo Państwowe, Jelenia Góra
(Polska)

Sposób otrzymywania hormonu adrenokortikotropowego na drodze oczyszczania półproduktu ACTH I

1

Metody oczyszczania ACTH przy użyciu róż-
nego typu adsorbentów, jak np. pochodnych ce-
lulozy, wymienniczy jonów itp. stanowią przed-
miot licznych publikacji naukowych i opra-
cowań patentowych. Spośród nich klasyczną
metodą postępowania, opublikowaną w amery-
kańskich czasopismach naukowych w latach
1951 — 1952 przez Payne'a, Raben'a i Astwood'a
jest adsorpcja ACTH z wodnego rozcieńczone-
go kwasu organicznego, najczęściej 0,1 n kwa-
su octowego, elucja substancji czynnej wod-
nym, rozcieńczonym mocnym kwasem mineral-
nym, przeważnie 0,1 n kwasem solnym, i wy-
trącanie preparatu z roztworu nadmiarem ace-
tonu, alkoholu lub wydzielenie przez liofiliza-
cję.

Jako adsorbenty oprócz celulozy, którą za-
stosował Payne (J. Biol. Chem. 187, 719 (1951))
stosuje się również jej pochodne takie, jak kar-
boksyceluloza, zwana także oksycelulozą (Astwo-
od i inni, J. Am. Chem. Soc. 73, 2969 (1951))
i karboksymetylocelulozę (J. D. H. Homan i L.
P. Ederzeel, opis patentowy niemiecki nr
1053732).

Wyniki znanych sposobów postępowania, za-
leżnie od użytego materiału wyjściowego (jego
metody otrzymywania, rodzaju zwierząt, od
których pochodziły gruczoły, sposobu konser-
wacji przysadek itp.) oraz stosowanego adsor-
benta różnią się znacznie od siebie tak pod

2

względem skuteczności działania preparatu, jak
i wydajności procesu oczyszczania. Największe
wydajności procesu oraz największą aktywność
preparatu uzyskuje się stosując karboksycelulo-
zę. Według Astwood'a (J. Am. Soc. 73, 2969,
2970 (1951)) wydajność ta wynosi 40 — 60%
i chociaż niektóre opisy patentowe podają nieco
lepsze rezultaty, to jednak, jak stwierdzili J. D.
H. Homan i L. P. Ederzeel (opis patentowy nie-
miecki nr 1053732) rzadko udaje się je uzyskać.

W przeprowadzonych próbach zastosowania
metody Astwood'a oraz licznych drobnych jej
modyfikacji, będących przedmiotem różnych pa-
tentów, do oczyszczania ACTH I, uzyskanego
sposobem według patentu nr 40759 z przysadek
świńskich, najbogatszych w czynnik adrenokor-
tikotropowy, ustalono, stosując jako adsorbenty
karboksycelulozę i karboksymetylocelulozę, że
wydajność tej metody waha się w granicach 30
— 55% oraz że rozbieżność wyników jest znaczna.

Ustalono następnie, że w trakcie procesu oczy-
szczania ACTH I, uzyskanego według opisu
patentowego nr 40759 adsorpcja na karboksy-
celulozie nie jest selektywna i z materiału wyj-
ściowego adsorbuje się nie tylko frakcja najbo-
gatsza w składnik kortikotropowy, lecz także
substancje zbliżone budową chemiczną do
ACTH, posiadające bardzo niskie działanie hor-
monu. W czasie procesu desorpcji substancje
te wraz z frakcją aktywną, zostają wyeluowane

i przechodzą do roztworu. Wydzielenie z niego drogą liofilizacji ACTH w postaci suchego proszku, prowadzi do uzyskania preparatu nisko-aktywnego i niezbyt czystego, ponieważ wszystkie frakcje będące w eluacie przechodzą do preparatu. Tak uzyskany produkt nie wykazuje również wymaganej rozpuszczalności w roztworze soli fizjologicznej (40 j/m/ml).

Stosując metodę wydzielenia ACTH w postaci suchego proszku, to jest wytrącanie z eluatu przy naturalnym pH roztworu 1 — 1,3 uzyskuje się niską wydajność procesu 30 — 55%, przy czym aktywność preparatu jest również różna dla różnych serii i niezadowalająca.

Stwierdzono, że stosując, jako materiał wyjściowy do oczyszczania, ACTH I otrzymany według opisu patentowego nr 40759 i postępując z nim aż do fazy desorpcji z karboksycelulozy zgodnie z przepisem Astwood'a (J. Am. Soc. 73 2969 — 2970), można z każdej serii i z wysoką wydajnością, uzyskać preparat doskonale rozpuszczalny nawet w dużych stężeniach w soli fizjologicznej oraz w wodzie i o jednakowej maksymalnej ilości jednostek ACTH w 1 mg substancji, jeżeli według wynalazku przed wytrąceniem hormonów z eluatu acetonem lub alkoholem doprowadzi się w eluacie za pomocą 5% wodnego roztworu wodorotlenku sodowego wartość pH do 2,4.

Zgodnie z powyższym, półprodukt ACTH I uzyskany przez ekstrakcję przedniego płata przysadki mózgowej zakwaszoną wodnoalkoholową mieszaniną w temperaturze wrzenia, poddaje się według wynalazku adsorpcji na karboksycelulozie, po czym eluuje rozcieńczonym kwasem solnym, a następnie wytrąca z eluatu ACTH nadmiarem acetonu przy wartości pH = 2,4.

W preparacie, otrzymanym sposobem według wynalazku, ilość jednostek międzynarodowych ACTH w 1 mg substancji zależy jedynie od rodzaju zwierząt, z których pochodzą gruczoły, i od sposobu konserwacji przysadek (mrożone lub acetonowane). Nie obserwuje się natomiast wahań aktywności preparatu i wydajności procesu, co jest charakterystyczne dla innych metod.

Znaczenie właściwej wartości pH roztworu dla aktywności preparatu zilustrowano w tabeli. Tabela odnosi się do półproduktu ACTH otrzymanego według opisu patentowego nr 40759 z acetonowanych przysadek świńskich, oczyszczonego zgodnie z wynalazkiem.

Zależność aktywności ACTH od wartości pH roztworu przed wytrąceniem

pH	2,2	2,4	2,6	2,8	3,0
j/m/mg	13,39	17,04	14,29	11,47	8,93

W tabeli podano wyniki średnie z 38 serii. Aktywność preparatu oznaczona metodą inwulucji grasicy szczura (Methods in Hormone Research ACADEMIC PRESS New York and London 1962, Thymus Involution Assay — 661).

Przy stosowaniu roztworu o różnej wartości pH uzyskuje się wyniki dość znacznie odbiegające od siebie w poszczególnych seriach, zawsze jednak niższe niż przy stosowaniu roztworu o wartości pH = 2,4, przy której uzyskana aktywność preparatu prawie nie ulega wahaniu i wynosi od 16,82 j/m/mg do 17,07 j/m/mg. Aktywność tę uzyskuje się przy jednocześnie wysokiej wydajności procesu 85 — 95% w stosunku do wyjściowej ilości jednostek.

W przypadku stosowania ACTH I otrzymanego ze świeżych przysadek uzyskuje się sposobem według wynalazku znacznie lepsze wyniki.

Przy stosowaniu jako półproduktu ACTH I otrzymanego z przysadek bydłych uzyskuje się aktywność 13 j/m/mg oraz wydajność procesu 60 — 85%, z ACTH I uzyskanego z przysadek ciętych uzyskuje się aktywność 10 j/m/mg, a wydajność procesu 50 — 70%.

Preparat otrzymany sposobem według wynalazku jest wolny całkowicie od innych hormonów przysadki, zwłaszcza oksytocyny i wazopresyny, wykazuje doskonałą rozpuszczalność w wodzie 250 j/m/ml a także w roztworze soli fizjologicznej 50 j/m/ml.

Przykład. 1000 g ACTH I (otrzymanego według opisu patentowego nr 40759) umieszcza się w kubie szklanym, zalewa 32,200 l 0,1 n kwasu octowego i miesza aż do rozpuszczenia. Do roztworu dodaje się 5%-ego roztworu wodorotlenku sodowego do wartości pH = 3,5 — 3,6, po czym sączy do uzyskania klarownego przesączu. Do przesączu dodaje się 188 g odpowiednio przygotowanej karboksycelulozy (posiadającej około 10% grup karboksylowych) i miesza w temperaturze pokojowej w ciągu 20 — 24 godzin. Po tym czasie osad odsącza się, umieszcza w lodówce, a do przesączu dodaje dalszych 100 g karboksycelulozy i prowadzi adsorpcję analogicznie jak poprzednio. Odsączony osad z II-giej adsorpcji łączy się z osadem z I-szej adsorpcji i ciągle mieszając (około 30 minut) zadaje 1750 ml 0,1 n kwasu octowego. Ciecz z przemycia stanowi odpad, natomiast osad przemywa się jeszcze trzykrotnie kwasem octowym, używając do każdego przemycia 1750 ml tego odczynnika. Następnie osad przemywa się dwukrotnie wodą używając za każdym razem 2500 ml wody destylowanej. Ostatni przesącz powinien dać negatywny wynik w reakcji z 20% kwasem sulfosalicylowym (próba na nieobecność białka). Tak przemity osad poddaje się w ciągu 20 — 24 godzin eluacji 15,600 l rozcieńczonego kwasu solnego. Osad odsącza się natomiast z roztworu zawierającego substancje o działaniu ACTH wytrąca się najbardziej aktywną frakcję przez doprowadzenie wartości pH eluatu za pomocą 5% roztworu wodorotlenku sodowego do 2,4 i zadaniu nadmiarem acetonu. Roztwór umieszcza się w chłodni (o temperaturze —15°C) i po pięciu dniach odsącza wytrącony osad ACTH, który przemywa się acetonem, eterem i suszy pod

próżnią. Preparat zawiera około 17 jednostek międzynarodowych w 1 mg (oznaczonych metodą inwolucji grasicy) oraz dobrą rozpuszczalność w wodzie i soli fizjologicznej. Z 1000 g ACTH I (to jest około 900 000 j.m) uzyskuje się 765 000 — 855 000 j.m wysokoaktywnego preparatu ACTH.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób otrzymywania hormonu adrenokortykotropowego na drodze oczyszczania półpro-

duktu ACTH I przez selektywną adsorpcję na pochodnych celulozy, eluowanie rozcieńczonym kwasem solnym i wytrącanie czystego ACTH acetonem, **znamienny tym**, że półprodukt ACTH I uzyskany przez ekstrakcję przedniego płata przysadki mózgowej zakwaszoną wodno-alkoholową mieszaniną w temperaturze wrzenia, poddaje się adsorpcji na karboksycelulozie, po czym eluuje rozcieńczonym kwasem solnym, a następnie wytrąca z eluatu ACTH nadmiarem acetonu przy wartości pH 2,4.

Dokonano jednej poprawki

