



POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ OPIS PATENTOWY

Nr 41449

Kl. 30 h, 2/04

Warszawska Wytwórnia Surowic i Szczepionek *)

Warszawa, Polska

Sposób otrzymywania hialuronidazy jądrowej

Patent trwa od dnia 4 stycznia 1957 r.

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania hialuronidazy jądrowej.

Dotychczas otrzymywanie hialuronidazy opiera się na następujących procesach: ekstrakcji enzymu z gruczołów, frakcjonowaniu ekstratów za pomocą soli ołowiu, usuwaniu nadmiaru jonów ołowiu przez dializę, frakcjonowaniu pozostałości po dializie za pomocą siarczanu amonowego, usuwaniu nadmiaru siarczanu amonowego przez dializę, wreszcie zagęszczaniu, filtracji i wyjałowianiu gotowego już produktu.

Po selektywnym frakcjonowaniu za pomocą soli ołowiu, otrzymuje się enzym — hialuronidazę w postaci związku kompleksowego z dwuwartościowym jonem ołowiu. Przy dalszej przeróbce konieczne jest usunięcie jonów ołowiu z kompleksu hialuronidaza — ołów, ponieważ jony te uniemożliwiają całkowicie prowadzenie dalszych procesów produkcyjnych.

Dotychczas jony te usuwa się przez dializę

wobec wody w temperaturze około 4°C , co jest procesem żmudnym, czasochłonnym, (trwającym w obecnych warunkach około 3 tygodni) i nieekonomicznym, ponieważ pomimo zachowania wszelkich środków ostrożności, następuje strata miana w wysokości około 20%.

Powyższe wady usuwa sposób według wynalazku, który eliminuje dializę kompleksu hialuronidaza — ołów.

Stwierdzono, że werseniany, jako znane związki sekwestrujące, posiadają działanie konkurencyjne w stosunku do kompleksu hialuronidaza — ołów i że wychwytyją z tego kompleksu ołów, w sposób ilościowy, przy czym reakcja zachodzi nawet w środowisku alkalicznym. Równocześnie werseniany wychwytyją i inne jony metali ciężkich, między innymi jony żelaza, które inaktywują ten enzym już w stężeniach rzędu 10^{-4} mola. Na skutek tego można wyeliminować całkowicie długotrwałą dializę przeprowadzoną w celu usunięcia ołowiu. Ponadto dzięki zastosowaniu wersenianów, można również odzyskać poważne ilości aktyw-

*) Właściciel patentu oświadczył, że współtwórcami wynalazku są Andrzej Budzyński i Teresa Drecka.

nej hialuronidazy z enzymu zinaktywowanego w czasie produkcji metalami ciężkimi, a w szczególności żelazem.

Dodanie niewielkiego nadmiaru wersenianu (około 5%-ego) chroni preparat w czasie dalszej przeróbki przed ewentualną inaktywacją przez metale ciężkie.

Sposób według wynalazku jest prosty w wykonaniu i nie wymaga żadnych dodatkowych nakładów pieniężnych, związanych z zastosowaniem jego w produkcji.

Roztwór hialuronidazy, który według dotychczas stosowanego sposobu powinien być poddany dializie, usuwającej ołów, alkalizuje się 2n amoniakiem do pH 8,2, po czym dodaje się do niego tyle 5%-go roztworu wodnego wersenianu dwusodowego (a najkorzystniej wersenianu dwusodowo — wapniowego) aż nastąpi całkowite rozpuszczenie powstałego osadu. Ponieważ w czasie reakcji pH roztworu spada do wartości około 5,8, ponownie wprowadza się do niego 2n — amoniak do uzyskania pH = 8,2 i dodaje znowu 5%-go roztworu wersenianu. Otrzymany roztwór poddaje się frakcjonowaniu za pomocą siarczanu amonowego w dotychczas stosowany sposób i dalej przerabia w znany sposób.

Przykład: Przy użyciu 2300 ml hialuronidazy, sklarowanej na filtrze Seitza, o mianie 200 TRU/ml (łącznie 460000 TRU) zużyto na doprowadzenia pH roztworu do 8,2 — 185 ml 2n — amoniaku, 400 ml 5%-go wersenianu dwusodowego, następnie jeszcze 30 ml 2n — amoniaku na ponowne doprowadzenie pH do 8,2 i dodatkowo 20 ml 5%-go roztworu wersenianu dwusodowego. Następnie otrzymany roztwór poddano w sposób znany frakcjonowaniu za po-

mocą siarczanu amonowego i wydializowano całkowicie jony NA_4^+ . Otrzymano 2100 ml roztworu hialuronidazy o mianie 740 TRU/ml czyli łącznie 1550000 TRU.

Przy przerobie tej samej ilości hialuronidazy (460000 TRU) za pomocą dotychczas stosowanej dializy w celu usunięcia jonów ołowiu otrzymano zaledwie 200.000 TRU.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania hialuronidazy jądrowej, przez ekstrakcję enzymu z gruczołów, frakcjonowanie ekstraktu za pomocą soli ołowiu, usuwanie jonów ołowiu z kompleksu hialuronidaza — ołów, frakcjonowanie pozostałości wolnej od jonów ołowiu za pomocą siarczanu amonowego, usuwanie nadmiaru siarczanu amonowego przez dializę, zagęszczenie, filtrację i wyjałowienie gotowego produktu, znamieny tym, że usuwanie jonów ołowiu z kompleksu hialuronidaza — ołów przeprowadza się za pomocą soli kwasu wersenowego (etylenodwuaminoczworoowego) najkorzystniej wersenianu dwusodowo-wapniowego.
2. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że hialuronidazę zinaktywowaną w czasie jej przerobu jonami metali ciężkich, uaktywnia się przez usunięcie jonów tych metali za pomocą soli kwasu wersenowego.

Warszawska Wytwórnia

Surowic i Szczepionek

Zastępca: Kolegium Rzeczników Patentowych