



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

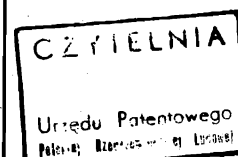
Zgłoszono: 21.09.77 (P. 200995)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 23.04.79

Opis patentowy opublikowano: 30.06.1982

Int. Cl.² A61K 35/12



Twórcy wynalazku: Andrzej Lipka, Henryk Jaskólski, Kazimierz Zabłocki, Józef Minkowski

Uprawniony z patentu: Drwalewskie Zakłady Przemysłu Bioweterynaryjnego, Drwalew (Polska)

Sposób otrzymywania oczyszczonych albumin zwierzęcych

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania oczyszczonych albumin zwierzęcych, nadających się do badań diagnostycznych.

Znane jest otrzymywanie czystych białek zwierzęcych typu albumin-globulin i immunoglobulin z plazmy lub surowicy krwi. Produkty te otrzymuje się według metody Cohna, przeważnie drogą frakcjonowania alkoholem lub wysalania elektrolitami.

Znana jest również metoda otrzymywania czystych frakcji białkowych z plazmy lub krwi przez wytrącanie kompleksów metalami na przykład cynkiem.

Sposoby oparte o tę metodę mają mniejsze znaczenie ekonomiczne, są żmudne z uwagi na konieczność późniejszego usuwania metali z kompleksów białkowych.

Inne znane sposoby otrzymywania preparatów białkowych o wyjątkowej wysokiej czystości elektroforetycznej i nie zmienionej czystości strukturalnej opierają się na stosowaniu żeli, wymieniaczy jonowych oraz polietylenoglikolu.

Celem wynalazku jest otrzymywanie czystych albumin zwierzęcych, nadających się do badań diagnostyki klinicznej przy zastosowaniu jako surowca wyjściowego frakcji odpadowej przy produkcji immunoglobulin zwierzęcych. Frakcja ta powstaje przy przerobieniu surowicy lub plazmy krwi zwierzęcej na drodze wysalania immunoglobulin

2

za pomocą siarczanu sodowego i praktycznie stanowi bezużyteczny odpad.

Stwierdzono, że z frakcji tej można otrzymać albuminy zwierzęce o stopniu czystości wymaganym do celów diagnostyki laboratoryjnej, jeżeli proces oczyszczania prowadzi się najpierw obniżając zawartość siarczanu sodowego w odpadowym płynie z około 13% do około 3,5–4% przez krystalizację w temperaturze obniżonej od 0°C (–5)°C, a następnie dalsze frakcjonowanie i oczyszczanie albumin prowadzi się w obecności resztek siarczanu sodowego za pomocą alkoholu etylowego.

Jak bowiem stwierdzono, obecność niewielkiej ilości siarczanu sodu w oczyszczonym układzie albumin działa jako aktywator oddzielania się homopigmentów od albumin w trakcie procesu frakcjonowania etanolem. W układzie tym istnieje zwiększona siła jonowa, pochodząca z siarczanu sodu, co jak stwierdzono zgodnie z wynalazkiem zapewnia prawidłowy rozdział homopigmentów od albumin.

Otrzymany sposobem według wynalazku produkt odznacza się wysoką czystością elektroforetyczną i bardzo małą lub śladową zawartością homopigmentów i w pełni odpowiada stawianym wymaganiom.

Proces prowadzi się początkowo przy wartości pH 7 obniżając temperaturę do 0° (–5)°C. Następuje wtedy krystalizacja siarczanu sodu z równoczes-

nym usunięciem części homopigmentów. Otrzymany odcinek, który zawiera głównie albuminy zanieczyszczone jeszcze homopigmentami jak również białkami globulinowymi doprowadza się do pH 5,1—5,3 i zadaje etanolem do stężenia około 15% doprowadzając jednocześnie temperaturę stopniowo do -4°C . W warunkach tych wytrącają się resztki białek globulinowych oraz homopigmentów.

Po oddzieleniu fazy ciekłej od osadu, na drodze wirowania w temperaturze do -4°C w odcieku znajdują się albuminy, które wymagają dalszego oczyszczania. W tym celu doprowadza się wartość pH odcieku do 4,8 i zadaje oziębionym etanolem do 40% stężenia. Cały układ oziębia się do temperatury -8°C .

Otrzymany osad zanieczyszczonej albuminy przeemywa się 40% etanolem i rozpuszcza w wodzie destylowanej do zawartości białka około 4%, doprowadza pH roztworu do wartości pH 5,3 i dodaje NaCl w celu doprowadzenia siły jonowej roztworu od 0,3—0,6.

Mieszanie oziębia się do temperatury -5°C i doprowadza stężenie etanolu do 25%. Powstały osad balastowy oddziela się na drodze wirowania, zaś odciek po doprowadzeniu pH do 4,8 zadaje etanolem do stężenia 40% i utrzymuje temperaturę -8°C .

Wytrącony osad albumin oddziela się przez wirowanie i poddaje dializie, a następnie suszeniu poprzez liofilizację lub metodą rozpyłową.

Do korekty wartości pH stosuje się odpowiednio 1 n HCl lub 1 n NaOH.

Albuminy oczyszczane sposobem według wynalazku są wolne od homopigmentów i w pełni odpowiadają wymogom stawianym dla preparatów stosowanych w diagnostyce klinicznej.

Siarczan sodu wyodrębniony w trakcie tego procesu i po rekrystalizacji stanowi chemiczny siarczan sodu.

Przykład I. W 100 kg surowicy bydlęcej o pH 7,0—7,8 rozpuszcza się w temperaturze $+37^{\circ}\text{C}$ — $+39^{\circ}\text{C}$ 14,5 kg bezwodnego siarczanu sodu. Wypada gęsty osad globulin będący w przeważającej części gammaglobuliną.

Osad ten po odwirowaniu stanowi produkt wyjściowy do otrzymania w toku dalszego oczyszczania immunoglobuliny bydlęcej do użytku weterynaryjnego.

Równocześnie otrzymuje się około 100 kg centryfugatu będącego płynem odpadowym, zawierającym alfa, beta, gammaglobuliny (w niewielkiej ilości) oraz prawie całą albuminę. Zawartość białka spada z 7% wyjściowych na około 5,5% w płynie odpadowym z czego około 3% stanowią albuminy. Płyn ten oziębia się do -3°C pozwalając na powolną krystalizację siarczanu sodu w ciągu 2—3 dni.

W temperaturze bliskiej zera odsacza się krystalizat od płynu. Otrzymuje się około 75 l filtratu zawierającego około 3,5% siarczanu sodu i około 6% białka.

Za pomocą 1n HCl koryguje się pH roztworu do 5,3, obniża stopniowo temperaturę do -4°C wkraplając do stężenia 15% oziębiony bezwodny etanol. Wypada osad dalszych globulin balastowych.

Po odwirowaniu otrzymuje się osad balastowy oraz około 80 dm³ centryfugatu o zawartości około 3% białka. Obniżając pH do 4,8 wkrapla się oziębiony etanol do stężenia 40% w temperaturze -8°C . Wypada zanieczyszczony osad albuminowy w ilości około 10 kg. Osad przeemywa się 40% etanolem i otrzymuje się lekko zanieczyszczone albuminy prawie wolne od siarczanu sodu. Osad ten rozpuszcza się w 50 l wody destylowanej do zawartości białka około 4% i doprowadza się pH do 5,3 za pomocą 1n NaOH i dodaje się 900 g NaCl. Następnie obniża się stopniowo temperaturę do -5°C dodając oziębiony etanol do stężenia 25%. Wypadają resztki zanieczyszczeń globulinowych.

Osad balastowy oddziela się przez wirowanie. Otrzymane około 60 l centryfugatu po obniżeniu pH ponownie do 4,8 za pomocą 1n HCl doprowadza się do koncentracji etanolu równej 40%. Obniżając stopniowo temperaturę do -8°C wypada około 7 kg jasnego osadu albuminy zwierzęcej.

Otrzymany osad zawiesza się do dializy celem otrzymania roztworu o niskiej zawartości soli i poddaje się następnie liofilizacji. Otrzymany proszek w ilości około 1,2 kg jest końcowym preparatem. Jego czystość elektroforetyczna w buforze weronalowym o pH 8 i sile jonowej 0,075 wynosić musi nie mniej niż 95%.

Produkt może zawierać do 1% popiołu. Wilgotci nie mniej niż 2%. Wydajność procesu około 40%.

Przykład II. Do 100 l plazmy bydlęcej o pH 7,0 dodaje się 7,0 kg bezwodnego siarczanu sodu. Wypada osad fibrynogenu w ilości około 3,0 kg.

Powstały osad odwirowuje się. Do centryfugatu w ilości 92 l dodaje się 6,9 kg bezwodnego siarczanu sodu. Wypada gęsty osad globulinowy stanowiący produkt wyjściowy do otrzymania immunoglobulin bydlęcych. Dalsze postępowanie jak w przykładzie I.

Przykład III. Do momentu otrzymania dializatu proces oczyszczania albumin przebiega zgodnie z opisem w przykładzie I. Otrzymany dializat poddaje się suszeniu w suszarni rozpyłowej. Otrzymany proszek stanowi produkt finalny albuminy bydlęcej do celów diagnostycznych.

Sucha albumina otrzymana w procesie suszenia metodą rozpyłową różni się od otrzymanej na drodze liofilizacji jedynie postacią zewnętrzną. Tak otrzymana albumina ma postać zbitą drobnokoloidalną i rozpuszcza się nieco wolniej.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób otrzymywania oczyszczonych albumin zwierzęcych, nadających się zwłaszcza do badań diagnostycznych, polegający na frakcjonowaniu alkoholem lub wysalaniu elektrolitami, **znamienny** tym, że frakcje odpadowe przy produkcji immuno-

globulin uwalnia się od nadmiaru siarczanu sodowego przez krystalizację w temperaturze od 0 do -5°C do zawartości 3,5—4% siarczanu sodowego

w płynie odpadowym, a następnie dalsze frakcjonowanie i oczyszczanie albumin prowadzi się w znany sposób.