



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

для служебного пользования ЭКЗ. №

(19) SU (11) 1607137 A1

(51)5 A 61 K 37/47, 35/16

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГКНТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

1

(21) 4661776/30-14

(22) 08.02.88

(71) Институт проблем онкологии им. Р. Е. Кавецкого

(72) Н. К. Бердинских, Р. В. Басова, Ю. В. Волощенко, И. Н. Гавриш, С. Н. Дробаха, В. И. Лившиц и Н. М. Лялюшко

(53) 615.361.018/51/55(088.8)

(56) Авторское свидетельство СССР № 991633, кл. А 61 К 35/16, 1982.

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА

(57) Изобретение относится к медицинской промышленности и касается способа получения ферментного препарата церулоплазмина. Цель изобретения – устранение пирогенности и повышение степени очистки. Способ осуществляется гомогенизацией отходов производства гамма-глобулина фракции III по Кону в растворе хлористого

2

натрия, сорбцией гомогената на ДЭАЭ-целлюлозе, элюцией 0,15–0,17 М раствором хлористого натрия, осаждением целевого продукта этанолом в конечной концентрации 65–75% об.%, растворением осадка в 0,25–0,26 М растворе хлористого натрия, центрифугированием, корректированием рН до 5,2–5,3 и доведением до 24–26°C, осаждением этиловым спиртом и хлороформом до конечной концентрации соответственно 24–26 и 2–4 об.%, перемешиванием 25–30 мин, центрифугированием образовавшегося осадка, доведением концентрации этилового спирта до 45–55 об.%, выдерживанием в течение 12–18 ч при минус 10–15°C, осаждением осадка центрифугированием, растворением его, стерилизующей фильтрацией и лиофильным высушиванием. Препарат является апиогенным. 2 табл.

Изобретение относится к технологии получения фермента крови человека – церулоплазмина и может быть использовано при производстве медицинских препаратов.

Цель изобретения – устранение пирогенности и повышение степени очистки.

Пример 1. 26 кг осадка фракции III по Кону плацентарной сыворотки, хранившейся в течение 1,5 мес, гомогенизируют в 130 л охлажденного до 4°C 0,05 М раствора натрия хлористого, измеряют рН гомогената и доводят его до рН 6,3. В полученную суспензию добавляют 3,5 кг ДЭАЭ-целлюлозы (бисерной, фирмы Реанал ВНР). Смесь оставляют при слабом перемешивании на

18 ч при 4°C. Целлюлозу с сорбированным церулоплазмином отмывают от несорбированных белков на нутч-филтре 2000 л охлажденного до 3–4°C 0,08 М раствора натрия хлористого до величины оптической плотности жидкости на выходе при длине волны 280 нм (E_{280}), равной 0,100. Отмытый от балластных белков сорбент переносят в хроматографическую колонку и производят десорбцию церулоплазмина охлажденным до 3–4°C 0,16 М хлористым натрием. Полученные 8 л элюата осаждают охлажденным до 0°C этиловым спиртом до конечной концентрации 65 об.% с последующим центрифугированием при 12 тыс. об/мин в течение 1 ч.



(19) SU (11) 1607137 A1

Осадок полуфабриката церулоплазмина в количестве 320 г растворяют в 1 л 0,24 М раствора натрия хлористого, полученный раствор просветляют центрифугированием 1 ч при 6 тыс. об/мин для удаления нерастворившихся денатурированных балластных белков. Центрифугат объемом 1,25 л имеет рН 6,0. Раствором 1 н соляной кислоты доводят рН до 5,2 и производят осаждение липопротеидных примесей смесью спирта — хлороформа, приливая к центрифугату при перемешивании 0,453 л этилового спирта и 50 мл хлороформа до конечной концентрации этих ингредиентов соответственно 24 и 4 об.%. Смесью перемешивают 30 мин при 24°C и образовавшийся осадок отделяют центрифугированием в течение 1 ч при 3 тыс. об/мин. Получают 1,6 л центрифугата, к которому для осаждения церулоплазмина добавляют при перемешивании 0,6 л охлажденного до 0°C этилового спирта и оставляют для формирования осадка церулоплазмина при минус 10°C на 18 ч. Образовавшийся осадок получают центрифугированием при 3 тыс. об/мин в течение 1 ч. 25 г получившегося осадка растворяют, подвергают стерилизующей фильтрации и лиофилизируют. Выход препарата в данном примере составляет 0,5 г церулоплазмина на 1 кг сырья, его оптический коэффициент 0,041; биологическая активность 16,2 усл.ед. Препарат апиrogenный.

Пример 2. 30 кг фракции III по Кону плацентарной сыворотки, хранившейся в течение 1 мес гомогенизируют в 150 л 0,05 М раствора натрия хлористого. К гомогенату добавляют 3,5 кг ДЭАЭ-целлюлозу, доводят рН смеси до 6,3 и оставляют при слабом перемешивании на 16 ч при 4°C. Целлюлозу с сорбированным церулоплазмином отмыывают от балластных белков на нутч-филтре через хлопчатобумажную ткань 2100 л охлажденного 0,08 М раствора натрия хлористого до оптической плотности на выходе $E_{280}=0,110$. Затем сорбент переносят в хроматографическую колонку и производят десорбцию церулоплазмина 0,15 М раствором натрия хлористого при 4°C. Полученные 8,5 л элюата осаждают охлажденным этиловым спиртом до конечной концентрации 75 об.%, и осадок отделяют центрифугированием при 12 тыс. об/мин 1 ч; 380 г осадка растворяют в 1 л 0,26 М раствора натрия хлористого, центрифугируют в течение 1 ч для отделения нерастворившихся денатурированных балластных белков, доводят рН до 5,3 и к полученному 1,25 л центрифугату добавляют 0,0453 л этилового спирта и 50 мл хлороформа. Смесью перемешивают при 24°C в течение 30 мин и образовавшийся

осадок отделяют центрифугированием при 3 тыс. об/мин в течение 1 ч; 1,5 л центрифугата выдерживают 12 ч при минус 10°C, добавляя к нему при перемешивании 0,62 л этилового спирта, чтобы конечная концентрация спирта в растворе составляла 55 об.%. Получено 31 г осадка, раствор которого был подвергнут стерилизующей фильтрации и лиофилизации. Выход препарата в данном примере составляет 0,4 г церулоплазмина на 1 кг сырья, его оптический коэффициент 0,043, биологическая активность 15,9 усл.ед., препарат апиrogenный.

Пример 3. 33 кг осадка фракции III по Кону плацентарной сыворотки, хранившейся 2 мес, гомогенизируют в 160 л 0,05 М раствора натрия хлористого. К гомогенату добавляют 3,5 кг ДЭАЭ-целлюлозу, доводят рН до 6,3 и оставляют при слабом перемешивании на 16 ч при 4°C. После сорбции целлюлозу отмыывают от балластных белков на нутч-филтре через хлопчатобумажную ткань 0,08 М раствором хлористого натрия до оптической плотности на выходе при $E_{280}=0,115$. Отмытый сорбент переносят в хроматографическую колонку и производят десорбцию церулоплазмина охлажденным 0,17 М раствором натрия хлористого при 4°C. Полученные 9 л элюата осаждают охлажденным этиловым спиртом до конечной концентрации 70 об.%, и полуфабрикат церулоплазмина отделяют центрифугированием при 12 тыс. об/мин в течение 1 ч 400 г осадка растворяют в 1 л 0,25 М раствора натрия хлористого, центрифугируют для отделения балластных нерастворившихся белков при 6 тыс. об/мин в течение 1 ч, доводят рН до 5,3 и к полученным 1,3 л центрифугата добавляют 0,46 л этилового спирта и 52 мл хлороформа. Смесью перемешивают при 24°C в течение 30 мин и образовавшийся осадок липопротеинов отделяют центрифугированием при 3 тыс. об/мин в течение 1 ч. К 1,8 л центрифугата добавляют при перемешивании 0,7 л охлажденного этилового спирта, доведя его конечную концентрацию до 55 об.%, и оставляют для формирования осадка церулоплазмина при минус 10°C. Было получено 32 г осадка. Выход церулоплазмина в данном примере составлял 0,5 г белка из 1 кг сырья, его биологическая активность 16,5 усл.ед., оптический коэффициент 0,043, препарат апиrogenный.

Пример 4. 35 кг осадка фракции 3 по Кону гомогенизировали в 185 л 0,05 М раствора натрия хлористого. К гомогенату добавили 3,5 кг ДЭАЭ-целлюлозы, довели рН до 6,3 и произвели сорбцию церулоплазмина (18 ч, 4°C). После отмывки сорбента от бал-

ластных белков перенесли его в хроматографическую колонку и элюировали церулоплазмин 0,16 М раствором охлажденного натрия хлористого. Полученные 8 л элюата осадили этиловым спиртом в конечной его концентрации 70 об. % и центрифугированием при 12 тыс. об/мин в течение 1 ч. Осадок полуфабриката церулоплазмينا в количестве 300 г растворили в 1 л 0,24 М раствора натрия хлористого, центрифугировали 1 ч при 6 тыс. об/мин и к центрифугату после доведения pH до 5,3 добавили 0,550 л этилового спирта и 40 мл хлороформа до конечной концентрации соответственно 26 и 2 об. %. Смесь перемешивали при 26°C в течение 25 мин и центрифугировали при 3 тыс. об/мин 1 ч. К 1,8 л центрифугата добавили этиловый спирт до конечной концентрации его 45 об. % и оставили для формирования осадка при минус 15°C. Получили 35 г церулоплазмينا, который подвергали стерилизующей фильтрации и лиофилизировали. Выход препарата в данном примере составляют 0,45 г на 1 кг сырья. Его оптический коэффициент - 0,042, биологическая активность 16,3 усл.ед. на мг белка. Препарат апирогенен.

В табл. 1 и 2 приведены данные по определению пирогенности в используемом сырье и в конечном препарате церулоплазмينا.

Предлагаемый способ позволяет получить апирогенный целевой продукт из заведомо пирогенного сырья. В результате осуществления способа устраняются также ряд примесей см. денситограмму

электрофоретического фракционирования церулоплазмينا.

Формула изобретения

- 5 Способ получения церулоплазмينا путем гомогенизации III фракции по Кону отходов производства при получении
- 10 гамма-глобулинов в растворе хлористого натрия, сорбции полученного гомогената на ДЭАЭ-целлюлозе, элюции двухкратного осаждения целевого продукта, этиловым спиртом осаждения образовавшегося осадка церулоплазмينا центрифугированием
- 15 при низкой температуре, его растворения, стерилизующей фильтрации и лиофильного высушивания, отличающийся тем, что, с целью устранения пирогенности и повышения степени очистки, элюцию с ДЭАЭ-целлюлозы осуществляют 0,15-0,17 М
- 20 раствором хлористого натрия, после элюции целевой продукт осаждают этиловым спиртом до конечной концентрации 65-75 об. %, осадок растворяют в 0,25-0,26 М раствора хлористого натрия, центрифугируют, доводят pH центрифугата до 5,2-5,3 и температуру до 24-26°C, осаждение церулоплазмينا проводят добавлением этило-
- 25 вого спирта и хлороформа до конечной концентрации соответственно 24-26 и 2-4 об. %, перемешивают в течение 25-30 мин, образовавшийся осадок удаляют центрифугированием, повторное осаждение целевого продукта этиловым спиртом проводят из надосадочной жидкости в концентрации
- 30 45-55 об. % выдерживают 12-18 ч при минус 10-15°C.

Таблица 1

Образец	Срок хранения, мес	Величина максимального повышения температуры			Сумма величин максимального повышения температуры
		1-й кроль	2-й кроль	3-й кроль	
1	Свежий	0,8	0,5	0,8	2,1
2	1,0	0,9	0,9	0,6	2,4
3	1,5	1,2	1,0	0,5	2,7
4	1,3	1,3	1,3	1,4	4,0
5	1,0	0,7	0,9	0,7	2,3
6	2,0	1,2	1,0	0,8	3,0
7	1,5	0,8	1,2	0,6	2,6
8	Свежий	0,7	0,6	0,7	2,0
9	1,3	0,8	0,8	0,8	2,4
10	1,0	0,7	0,6	1,0	2,3

Таблица 2

Образец	Величина максимального повышения температуры			Сумма величин максимальных подъемов температуры
	1-й кроль	2-й кроль	3-й кроль	
1	0	0,2	0,1	0,3
2	0,3	0,4	0,5	1,2
3	0,6	0,7	0,5	1,8
4	0,3	0,3	0,6	1,2
5	0	0,2	0,5	0,7
6	0,3	0,3	0,4	1,0
7	0,2	0,3	0,4	0,9
8	0,1	0,2	0,2	0,5
9	0,5	0,3	0,4	1,2
10	0	0,3	0	0,3

1

Редактор С.Рекова

Составитель С.Мельникова
Техред М.Моргентал

Корректор И.Эрдейи

Заказ 3914/ДСП

Тираж 413

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул.Гагарина, 101