



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 28.04.77 (P. 197699)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 06.11.78

Opis patentowy opublikowano: 10.01.1983

CZYTELNIA

Urząd Patentowy
Warszawa

Int. Cl.² C07C 103/52

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Eli Lilly and Company, Indianapolis (Stany Zjednoczone Ameryki)

Sposób oczyszczania glukagonu

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób oczyszczania glukagonu, będącego cennym środkiem biologicznie czynnym, zwłaszcza powodującym zwiększanie stężenia glikozy we krwi.

Wkrótce po odkryciu insuliny w r. 1921 przez Bantinga i Besta, kilku badaczy [Murlin i współpracownicy, J. Biol. Chem., 56, 252 (1923) i Kimball i Murlin, J. Biol. Chem., 58, 337 (1924)] stwierdziło, że niektóre trzustkowe wyciągi insuliny powodują przecukrzenie krwi. Substancję wywołującą ten skutek nazwano glukagonem. Wynikami dalszych badań było oczyszczenie i krystalizacja glukagonu [patrz Staub i współpracownicy, Science, 117, 628 (1953) i J. Biol. Chem., 214, 619 (1955)]. Strukturalnie glukagon jest pojedynczym łańcuchem polipeptydowym 29 aminokwasów. Kolejność aminokwasów w świńskim glukagonie ustalił Bromer z współpracownikami [J. Am. Chem. Soc., 79, 2807 (1957)].

Glukagon jako substancja powodująca zwiększenie stężenia glikozy we krwi jest przeciwieństwem dynamicznym insuliny, która powoduje niedocukrzenie krwi. Z tego względu glukagon ma ważne znaczenie przy traktowaniu niedocukrzenia krwi spowodowanego przez insulinę, jeżeli nie dysponuje się hipertonicznym roztworem glikozy.

Glukagon wykazuje również dodatnie działanie inotropowe [patrz Farach i Tuttle, J. Pharmacol. Exptl. Therap., 29, 49 (1960)]. Mianowicie, badania wykazały, że glukagon powoduje zwiększanie siły

2

skurczania serca, to też zaczęto szeroko stosować ten związek w stanach, w których konieczne jest zwiększanie tej siły [Van der Ark i współpracownicy, Amer. Heart J., 79, 481 (1970)].

Poza tym stwierdzono, że glukagon przejawia i inne działania biologiczne, np. powoduje rozluźnienie dwunastnicy przy jej rentgenowskim uwi-
docznianiu hipotonicznym [Miller i współpracownicy, Radiology, 108, 35 (1973)]. Glukagon działa też moczopędnie, rozszerza oskrzela, zmniejsza wydzielanie soków żołądkowych i zmniejsza stężenie lipidów i cholesterolu we krwi. Stosowano też glukagon w leczeniu trzustki [Stremmel, Pharmakotherapie In Kürze, 116, 69 (1974)].

Do wszystkich wyżej wymienionych celów niezbędny jest glukagon dobrze oczyszczony. Wiadomo, że zarówno insulina jak i glukagon są wytwarzane w trzustce, ale podczas gdy insulinę można wyosobniać i oczyszczać należycie znanymi sposobami, to wyosobnianie glukagonu, a zwłaszcza jego oczyszczanie, unikanie rozkładu i otrzymywanie produktu z dostateczną wydajnością, stwarza nadal poważne trudności. Przyczyną tego jest bliskie pokrewieństwo pomiędzy insuliną i glukagonem aczkolwiek przy wyosobnianiu insuliny trudności te przezwyciężono, to nie rozwiązano tego problemu w odniesieniu do glukagonu.

Znane sposoby oczyszczania glukagonu polegają na tym, że włókienka wytwarza się przy małej wartości pH, zwykle około 2,0, a więc w środowi-

sku, które sprzyja hydrolizie glukagonu. Produkty hydrolizy z reguły przejawiają zmniejszoną aktywność i np. dezamidoglukagon ma tylko około 60% hormonalnej aktywności glukagonu. Poza tym, wytwarzanie włókienek zależy od czystości glukagonu i gdy czystość ta maleje, wówczas tworzenie włókienek staje się trudniejsze, a nawet niemożliwe.

Glukagon ma tendencję do tworzenia żelu i wytwarzania włókienek w roztworach kwaśnych, to też przy oczyszczaniu glukagonu metodami chromatograficznymi w kwaśnych roztworach następują straty glukagonu na skutek jego żelowania i strącania się w kolumnie. Poza tym, w kwaśnych roztworach glukagon łatwo tworzy skupienia, co znacznie ogranicza selektywność i skuteczność odsączania żelu (usuwanie żelu na drodze chromatograficznej) w środowiskach kwaśnych.

Wynalazek umożliwia oczyszczanie glukagonu przy uniknięciu opisanych wyżej wad znanych sposobów, w warunkach łagodniejszych i selektywniej oraz z wysoką wydajnością.

Zgodnie z wynalazkiem glukagon oczyszcza się w ten sposób, że spęcznia się żel, który w stanie suchym może pobierać co najmniej około 4% wagowych wody i którego cząstki mają średnicę mniejszą niż około 100 mikronów i spęcznionym żelem upakuje się kolumnę. Do upakowanej kolumny wprowadza się wodny roztwór glukagonu o czystości co najmniej około 0,1%, mający wartość pH od około 9 do około 11 i eluuje glukagon z kolumny w temperaturze około 4–40°C wodnym eluentem o wartości pH tego samego rzędu co wartość pH roztworu glukagonu podawany na kolumnę. Roztwór glukagonu zawiera w 1 ml co najmniej około 0,01 mg glukagonu i mniej niż około 10% wagowo/objętościowych wszystkich stałych protein. Całkowita ilość glukagonu podawanego na kolumnę jest taka, aby na 1 litr złoża w kolumnie przypadało około 0,01–5 g glukagonu.

Stosowane tu określenie „oczyszczanie” oznacza, że zanieczyszczony glukagon, niezależnie od jego postaci to jest stały lub w wodnym roztworze, w wyniku oczyszczania występuje w stosunku do całkowitej ilości stałych protein w ilości większej niż przed oczyszczaniem. Tak więc czystość glukagonu, określana jako stosunek ilości glukagonu do całkowitej ilości stałych protein, zwykle wyrażana w procentach, rośnie.

Należy podkreślić, że przy stosowaniu procesu według wynalazku hydroliza glukagonu do monodezamidoglukagonu nie stanowi problemu, aczkolwiek hydroliza glukagonu w środowisku alkalicznym jest znana np. z publikacji Annable, *Acta Endocrinologica* 77, 706 (1974).

Wykres na rysunku przedstawia zależność optycznej gęstości eluatu i zawartości glukagonu od objętości eluatu w procesie według wynalazku, przedstawionym w przykładzie I.

Filtrowanie przez żel jest zabiegiem stosowanym w chromatografii do oddzielania substancji, np. protein, na podstawie wielkości cząsteczek. W procesie tym substancje rozdziela się na kolumnie zawierającej żel usieciowany w taki sposób, że w

każdej cząstce żelu tworzą się pory. Pory te mają określoną i dającą się mierzyć objętość, która jest wprost proporcjonalna do stopnia spęcznienia żelu i odwrotnie proporcjonalna do stopnia usieciowania. Ponieważ dostęp mniejszych cząsteczek do tych porów jest łatwiejszy niż cząsteczek większych, przeto przechodzenie mniejszych cząsteczek przez kolumnę jest szybsze niż cząsteczek większych.

Ogólnie biorąc, w procesie według wynalazku można stosować każdy żel pęczniący pod wpływem wody i odpowiedni przy przerobieniu roztworów protein. Jednakże w stanie suchym, przed spęcznieniem, powinien on mieć zdolność ponownego pobierania co najmniej około 4% wagowych wody w stosunku do wagi żelu w stanie suchym i jego cząstki powinny mieć średnice mniejsze niż około 100 mikronów. Korzystnie, zdolność pobierania wody przez żel wynosi od około 4 do około 98, a zwłaszcza od około 5 do około 20% wagowych. Średnice cząstek suchego żelu powinny być korzystnie mniejsze niż 80 mikronów, a zwłaszcza powinny wynosić od około 20 do około 80 mikronów.

Przykładami odpowiednich żelów są: skrobia, w tym też skrobia kukurydziana, usieciowany galaktomannan, usieciowany dekstran, agar, poliakryloamid, kopolimery amidu kwasu akrylowego z metyleno-bis (akryloamidem), kopolimery metyleno-bis (akryloamidu) z eterem winylowoetylowym glikolu dwuetylenowego i z winylopirolidonem. Korzystnie stosuje się usieciowane dekstrany, takie jak preparaty szeregu Sephadex firmy Pharmacia Fine Chemicals, Inc. Piscataway, St. Zj. Am.

Typ kolumny nie ma istotnego znaczenia w procesie według wynalazku i wysokość, średnica i kształt kolumny zależą od żądanych parametrów procesu. W miarę zwiększania wysokości kolumny maleje oczywiście szybkość przepływu, gdyż opór kolumny jest wprost proporcjonalny do jej wysokości. Z tych też względów korzystnie stosuje się upakowaną kolumnę taką, jak np. Pharmacia Sectional Column KS-370. Do normalnej produkcji odpowiednia jest kolumna o 4–6 sekcjach.

Glukagon oczyszcza się korzystnie zwłaszcza podając na kolumnę od około 0,08 do około 3,1 g glukagonu na 1 litr złoża, ale ogólnie biorąc można stosować około 0,01–5 g na 1 litr objętości złoża. Warunki najodpowiedniejsze dla danej kolumny można łatwo ustalić.

Żel można spęcznieć i upakowywać kolumnę spęcznionym żelem w dowolny, znany sposób, ale przeważnie spęcznieć się żel w eluencie. Można też jednak spęcznieć żel w 30% roztworze wodnym etanolu, dekantować drobne cząstki i następnie zastępować roztwór etanolu eluentem.

W zasadzie sposobem według wynalazku można oczyszczać zanieczyszczony glukagon dowolnego pochodzenia, pod warunkiem, że zawartość glukagonu wynosi co najmniej około 0,1%, a korzystnie co najmniej około 1% w stosunku wagowym. Tak np. można jako źródło glukagonu stosować nawet surowe frakcje proteinowe z trzustki, jak też i częściowo oczyszczony glukagon krystaliczny.

Zanieczyszczony glukagon można rozpuszczać w zakwaszonej wodzie, zwykle o wartości pH 3. Wartość pH doprowadza się następnie stosownie do potrzeby do 9—11 za pomocą rozcieńczonego roztworu wodnego zasady lub organicznej substancji buforowej. Można też, co jest korzystne, rozpuszczać zanieczyszczony glukagon w wodnym środowisku alkalicznym przy wartości pH 9—11. Odpowiednie są np. takie zasady jak wodorotlenek sodowy, potasowy, litowy lub amonowy, a najkorzystniej stosuje się wodorotlenek sodowy. Przykładami organicznych substancji buforowych są: glicyna z wodorotlenkiem sodowym i trój/hydroksymetylo/-aminometan. W razie potrzeby substancje nierozpuszczalne oddziela się znanymi sposobami. Jak wyżej wspomniano, roztwór zawierający glukagon wprowadza się na kolumnę przy wartości pH od około 9,0 do około 11, a korzystnie od około 9,0 do około 10,5. Wprawdzie nie jest konieczne, aby wartość pH roztworu glukagonu podawanego na kolumnę i wartość pH eluentu były identyczne, ale dużych różnic należy korzystnie unikać.

Roztwór glukagonu podawany na kolumnę powinien zawierać co najmniej 0,01 mg, korzystnie co najmniej około 0,05 mg, a najkorzystniej co najmniej około 0,5 mg glukagonu w 1 ml. Powinien on też zawierać mniej niż około 10%, korzystnie mniej niż 8%, a najkorzystniej mniej niż około 6% wagowo/objętościowych wszystkich protein stałych. W razie potrzeby roztwór glukagonu podawany na kolumnę może być buforowany, ale nie jest to konieczne. Korzystnie jest również, jeżeli podawany na kolumnę roztwór glukagonu zawiera środek chelatujący jon metalu dwuwartościowego i substancję stabilizującą, jak to opisano szczegółowo niżej.

W celu uzyskania zadowalających wyników, zanieczyszczony glukagon powinien być rozpuszczony w rozpuszczalniku o objętości mniejszej od objętości podczas rozdzielania, jak to wyjaśniono niżej.

W chromatografii, współczynnik rozdzielania K_d określa się jako stosunek stężenia substancji rozpuszczonej w fazie ruchomej do stężenia substancji rozpuszczonej w fazie nieruchomej. Podczas filtrowania przez żel fazą ruchomą jest rozpuszczalnik przepływający przez wolną przestrzeń pomiędzy cząstkami żelu, a fazą nieruchomą jest rozpuszczalnik wchłonięty przez cząstki żelu, to jest zatrzymany w porach w każdej z cząstek żelu. Tak więc K_d wyraża część rozpuszczalnika zatrzymanego w porach, która może być przenikana przez substancję rozpuszczoną.

Objętość eluowania V_e substancji rozpuszczonej można wyrazić równaniem:

$$V_e = V_0 + K_d \cdot V_1$$

w którym V_0 oznacza objętość wolnej przestrzeni w kolumnie, a V_1 oznacza objętość zatrzymanego rozpuszczalnika. Z powyższego równania współczynnik K_d wyraża się równaniem:

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_1}$$

Jeżeli ciężar właściwy wody przyjmie się jako =1,

wówczas $V_1 = aW_r$ przy czym a oznacza ciężar suchego żelu i W_r oznacza ilość wody ponownie pochłanianej przez żel. Zgodnie z tym:

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{aW_r}$$

i współczynnik K_d można w znany sposób określić doświadczalnie.

Zakładając, że roztwór zawiera 2 rozpuszczone substancje objętość eluowania dla każdej z tych substancji wyraża się wzorami:

$$V'_e = V_0 + K'_d V_1$$

$$V''_e = V_0 + K''_d V_1$$

Objętość rozdzielania V_s jest różnicą:

$$V_s = V''_e - V'_e \text{ czyli } V_s = (K''_d - K'_d) V_1$$

Z powyższego wynika, że stopień rozdzielania dwóch lub większej liczby rozpuszczonych substancji, jest częściowo zależny od obciążenia kolumny. Gdy ilość substancji rozpuszczonej mającej mniejszy ciężar cząsteczkowy zbliża się do ilości granicznej, która może być przyjęta przez pory, rozdzielanie dwóch substancji rozpuszczonych z konieczności maleje. W granicach obciążenia stosowanego zgodnie z wynalazkiem stopień rozdzielania może być różny i w niektórych przypadkach można stosować wyższe obciążenie kolumny, aby utrzymać w równowadze rozdzielanie w stosunku do wydajności.

Jak wspomniano wyżej, eluent powinien mieć wartość pH około 9—11, korzystnie 9—10,5, a zwłaszcza 9,5. Zwykle jako eluent stosuje się wodny roztwór zasady lub organicznej substancji buforowej, jaką stosuje się przy wytwarzaniu roztworu glukagonu podawanego na kolumnę, przy czym korzystnie jest stosować wodny roztwór wodorotlenku amonowego. Ewentualnie, a nawet korzystnie, eluent zawiera w 1 litrze do około 0,01 mola środka chelatującego jon metalu dwuwartościowego i/albo do około 0,5% objętościowych butanolu jako stabilizatora. Korzystnie zawartość butanolu wynosi 0,1% w stosunku objętościowym.

Jako środek chelatujący można stosować kwas etylenodwuamino-N,N,N',N'-czterooctowy, kwas 1,2-dwuaminopropylu-N,N,N',N'-czterooctowy [ED-TA].

Środek chelatujący można stosować w postaci wolnego kwasu lub jego soli z metalem alkalicznym albo soli amonowej. Korzystnie stosuje się 0,001 m stężenie środka chelatyzującego.

Kolumnę eluuje się w temperaturze około 4—40°C, korzystnie w temperaturze pokojowej lub niższej. Proces eluowania prowadzi się w znany sposób, korzystnie jednak mierząc absorpcję światła nadfioletowego o długości fali 280 milimikronów. Frakcje zawierające oczyszczony glukagon łączy się i przerabia w znany sposób, otrzymując krystaliczny glukagon o wysokim stopniu czystości.

Dalsza przeróbka zależy od czystości i stężenia glukagonu w eluencie prowadzi się ją znanymi spo-

sobami. Jeżeli eluent zawiera więcej niż około 10% wagowych glukagonu w stosunku do wszystkich substancji stałych zawartych w roztworze i zawartość glukagonu w eluencie jest większa niż około 3000 µg/ml, to zwykle krystalizuje się glukagon bezpośrednio z roztworu, przeważnie przy wartości pH 4,8–5,2, korzystnie 5,0. Można też krystalizować glukagon w obecności cynku przy wartości pH 7,5. Jeżeli czystość glukagonu w eluencie jest mniejsza niż około 10%, to znaczy, gdy glukagon stanowi mniej niż 10% substancji stałych rozpuszczonych w eluencie, wówczas wytrąca się glukagon w postaci 20% soli i przekrystalizowuje ją w kwaśnym środowisku, ewentualnie po uprzednim przefiltrowaniu przez żel. We wszystkich tych przypadkach otrzymuje się glukagon o pośrednim stopniu czystości, wymagający dalszego oczyszczania. Takie dodatkowe oczyszczania prowadzi się przez przekrystalizowywanie z słabo alkalicznego środowiska, to jest przy wartości pH 7–8, albo chromatograficznie w obecności wymieniacza jonów, lub też stosując oba te zabiegi. Korzystnie jest zwłaszcza rozpuszczać częściowo oczyszczony glukagon ponownie i podawać go drugiej filtracji przez żel sposobem według wynalazku i następnie krystalizować z eluentu w środowisku kwaśnym lub słabo zasadowym. W ten sposób otrzymuje się glukagon o czystości powyżej 90%. Sposób ten jest opisany niżej szczegółowo.

Przeważnie przy oczyszczaniu glukagonu sposobem według wynalazku na skalę techniczną stosuje się glukagon o czystości około 2–5% wagowych. Zwykle stanowi on frakcje proteinowe z trzustki, otrzymane przy wyosobnianiu i oczyszczaniu insuliny z gruczołów trzustkowych świni. Taki zanieczyszczony glukagon rozpuszcza się w zakwaszonej wodzie o wartości pH około 3, przy czym stosuje się ilość wody stanowiącą w przybliżeniu objętości złoza kolumny, która ma być stosowana. Otrzymany roztwór, przewidziany do podawania na kolumnę, zawiera na 1 litr objętości złoza 3–4 g stałych substancji, w tym 0,06–0,2 g glukagonu. Kolumnę zrównoważa się w temperaturze 25°C rozcieńczonym wodorotlenkiem amonu o wartości pH od około 9,0 do około 10,5 zawierającym 0,001 m roztworu EDTA i 0,1% objętościowych butanolu. Najkorzystniej jako żel stosuje się Sephadex G-50F.

Wartość pH roztworu glukagonu podawanego na kolumnę doprowadza się następnie do 9–11 za pomocą rozcieńczonego roztworu wodnego zasady lub organicznego roztworu buforowego i przed podaniem roztworu na kolumnę można go w razie potrzeby przesączyć w zwykły sposób, w celu usunięcia stałych części. Następnie roztwór glukagonu podaje się na kolumnę i eluuje opisanym wyżej roztworem wodorotlenku amonowego o wartości pH 9,5, zawierającym EDTA i butanol. Wartość współczynnika rozdzielania K_d wynosi 0,78–0,82 w eluencie, którego objętość wynosi około 20–25% objętości złoza. Stężenie glukagonu w eluencie wynosi korzystnie około 400–700 µg/ml i czystość jego wynosi powyżej około 10%. Jeżeli roztworu tego nie podaje się zaraz dalszemu oczyszczaniu, to przed magazynowaniem trzeba go zakwaszyć rozcieńczonym kwasem solnym do wartości pH oko-

ło 3. Frakcje zebrane przed i po właściwych frakcjach eluentu zawierającego glukagon zachowuje się i wykorzystuje przy dodatkowym oczyszczaniu glukagonu.

Przed dalszą przeróbką wartość pH eluentu zawierającego glukagon doprowadza się do około 5 za pomocą rozcieńczonego roztworu kwasu fosforowego lub rozcieńczonego roztworu wodnego wodorotlenku potasowego, po czym ogrzewa do temperatury 60°C, przesącza, chłodzi do temperatury około 5°C i pozostawia do krystalizacji. Krystaliczny glukagon oddziela się w dowolny, znany sposób, np. przez odwirowywanie i przemywa zimnym, roztworem wodnym chlorku sodowego o stężeniu 0,001% wagowego. Wszystkie ługi macierzyste zachowuje się do dalszego wykorzystania.

Krystaliczny glukagon rozpuszcza się w roztworze wodorotlenku amonowego o wartości pH 9,5, zawierającym EDTA i butanol, przygotowując roztwór zawierający około 2–6% wagowo/objętościowych glukagonu, około 0,265–0,75 g substancji stałych na 1 litr objętości złoza i około 0,1–1,875 g glukagonu na 1 litr objętości złoza. Całkowita objętość roztworu wynosi około 2,5–7,5% objętości złoza. Otrzymany roztwór, przeznaczony do podawania na drugą kolumnę, podaje się na kolumnę wypełnioną preparatem Sephadex G-50F, która ma objętość złoza o około 20% większą od objętości złoza pierwszej kolumny. Eluuje się w sposób wyżej opisany, przy czym zawartość glukagonu w eluencie wynosi zwykle około 500–3500 µg/ml. Wartość pH roztworu doprowadza się do około 7–8 i poddaje krystalizacji w temperaturze około 5–10°C. Po oddzieleniu krystalicznego glukagonu wszystkie ługi macierzyste i popłuczyny wykorzystuje się ponownie w procesie.

Sposób według wynalazku zilustrowano w przykładach. Przykład I przedstawia proces oczyszczania glukagonu z dwoma zabiegami filtrowania przez żel. Przykłady II i III są podane w celach porównawczych i stosuje się w nich znany sposób oczyszczania glukagonu z filtrowaniem przez żel i bez tego zabiegu. We wszystkich przykładach stosuje się taki sam zanieczyszczony glukagon, pochodzący z dwóch źródeł, a mianowicie: 1) bezpostaciową frakcję proteinową wyosobnioną przy wytwarzaniu krystalicznej insuliny cynkowej i 2) proteiny pozostałe w buforowanym za pomocą cytrynianu ługu macierzystym po krystalizacji insuliny cynkowej, wytrącanej za pomocą cynku. Obie frakcje proteinowe łączą się i prowadzi frakcjonowane wytrącanie przy wartości pH około 6,2, w obecności 0,75% chlorku sodowego i 0,5% fenolu (procenty wagowo-objętościowe). Szereg takich partii frakcjonowanie strączanych protein łączy się, oznaczając w nich zawartość glukagonu, aby otrzymać produkt wyjściowy zawierający 3,60% wagowych glukagonu.

Zawartość glukagonu oznacza się zmienioną nieco metodą oznaczania insuliny [Herbert i współpracownicy, J. Clin. Endocr., 25, 1375 (1965)], stosując rozcieńczanie radioaktywne i powlekany węgiel drzewny. Czystość glukagonu określa się w procentach wagowych w stosunku do całkowitej zawartości substancji stałych, którą oznacza się

znanymi sposobami. Wydajność procesu oznacza się w procentach glukagonu uzyskanego, w stosunku do całkowitej zawartości glukagonu w produkcie wyjściowym.

Przykład I. A. Przygotowywanie roztworu glukagonu podawanego na kolumnę. 200 g wyjściowej proteiny zawierającej glukagon rozpuszcza się w 5 litrach wodnego roztworu kwasu solnego o wartości pH 3,0 i w celu ułatwienia rozpuszczania doprowadza wartość pH roztworu do 11, dodając wodny roztwór wodorotlenku sodowego. Następnie za pomocą 3n kwasu solnego doprowadza się wartość pH roztworu do 9,5 i przesącza roztwór, otrzymując 5,675 litra przesączu.

B. Pierwsze filtrowanie przez żel. Chromatograficzną kolumnę złożoną z 4 jednostek Pharmacia KS-370/15 (Pharmacia Fine Chemicals, Inc.) upakowuje się preparatem Sephadex G-50F (Pharmacia Fine Chemicals, Inc.) i równoważy w temperaturze 25°C wodnym roztworem wodorotlenku amonowego o wartości pH 9,5, zawierającym 0,001 m EDTA i 0,1% butanolu. Kolumnę tę zasila się przygotowanym w sposób wyżej opisany roztworem glukagonu i eluuje roztworem wodnym wodorotlenku amonowego o wartości pH 9,5, zawierającym EDTA i butanol. Eluent wprowadza się w ilości 300–400 ml/minutę. W odcieku oznacza się zawartość protein mierząc w procentach przepuszczalność promieniowania o długości fali 280 nm za pomocą absorpcjometra /LKB Uvicord II firmy LKB Produkter AB, Sztokholm, Szwecja/. Po zebraniu 19,6 litra odcieku (objętość równa objętości pustych przestrzeni w kolumnie), zbiera się 22,4 litra frakcji zawierającej proteiny o większym ciężarze cząsteczkowym, po czym zbiera się trzy frakcje, a mianowicie: 1/2 filtry frakcji wstępnej, 2/11 litrów frakcji właściwej, zawierającej glukagon i 3/4 litry frakcji dodatkowej. Wartość pH frakcji zawierającej glukagon doprowadza się za pomocą 3n wodnego roztworu kwasu solnego do 5,5 i pozostawia na noc w temperaturze 25°C. Objętość tego roztworu wynosi 11 litrów, zawiera on 56 g łącznie substancji stałych, co odpowiada 4,6 mg/ml, a zawartość glukagonu wynosi 6,058 g, co odpowiada 551 µg/ml. Czystość glukagonu wynosi 11,97%, a wydajność 84,14%, w przeliczeniu na zawartość glukagonu w produkcie wyjściowym, która wynosi 7,20 g.

C. Pośrednia krystalizacja. Roztwór glukagonu w eluencie miesza się i ogrzewa do temperatury 60°C, doprowadza wartość pH roztworu do 5,0 za pomocą 3n wodnego roztworu kwasu solnego, przesącza gorący roztwór, chłodzi przesącz do temperatury około 5°C i pozostawia w tej temperaturze do krystalizacji glukagonu. Ług macierzysty najpierw dekantuje się, a następnie odwirowuje kryształy, zachowując ługi macierzyste. Krystaliczny glukagon rozpuszcza się w wodnym roztworze wodorotlenku amonowego o wartości pH 9,5, zawierającym EDTA i butanol, po czym przesącza, otrzymując 1,65 litra roztworu zawierającego 6,27 stałych substancji, co odpowiada 3,8 mg/ml, a zawartość glukagonu wynosi 3,82 g, co odpowiada 2,322

mg/ml. Czystość glukagonu wynosi 61,1%, a wydajność 53,1%.

D. Drugie filtrowanie przez żel. Przygotowuje się kolumnę chromatograficzną podobną do opisanej w ustępie A, lecz składającą się z 5 sekcji. Roztwór otrzymany w wyniku pośredniej krystalizacji podaje się na tę kolumnę i eluuje roztworem wodorotlenku amonowego o wartości pH 9,5, zawierającym EDTA i butanol. Eluent doprowadza się w ilości 500 ml/minutę i eluuje w sposób opisany w ustępie B, otrzymując 14,0 litrów frakcji zawierającej glukagon. Roztwór ten zawiera 5,6 g substancji stałych, to jest 0,40 mg/ml. Zawartość glukagonu wynosi 3,40 g, to jest 243 µg/ml. Czystość glukagonu wynosi 60,7% i wydajność 47,22%. Należy zaznaczyć, że ze względu na wspomniane wyżej dostosowywanie wartości pH, zawartość soli nieorganicznych w eluencie znacznie wzrasta. Ponieważ zaś te sole mają współczynnik K_d w przybliżeniu równy współczynnikowi glukagonu, przeto sole te nie są usuwane podczas filtrowania przez żel, a ponieważ czystość glukagonu określa się w odniesieniu do całkowitej zawartości substancji stałych wobec tego to drugie oczyszczanie pozornie nie powoduje oczyszczania. Jednakże w pewnej mierze zachodzi tu oczyszczanie glukagonu od innych protein. Innymi słowy, każdy z zabiegów powoduje zwiększanie czystości glukagonu, jeżeli czystość tę określa się w stosunku do całkowitej zawartości protein, a nie wszystkich substancji stałych.

E. Końcowa krystalizacja glukagonu. Wartość pH roztworu otrzymanego po drugim filtrowaniu doprowadza się do 7,5 dodając 20 ml 10% wodnego roztworu kwasu fosforowego, miesza roztwór w temperaturze 5°C w ciągu 18 godzin, w celu osiągnięcia możliwie dobrej krystalizacji, po czym pozostawia do odstania w ciągu około 72 godzin. Ług macierzysty oddziela się przez dekantację, po czym odwirowuje kryształy i ługi pozostawia do wykorzystania. Kryształy glukagonu przemywa się kolejno raz roztworem 0,001% chlorku sodowego, dwukrotnie wodą i raz bezwodnym eterem. Kryształy suszy się pod zmniejszonym ciśnieniem w ciągu nocy. Otrzymuje się 3,455 g krystalicznego glukagonu, którego czystość oznaczana przez analizowanie aminokwasów i metodą chromatograficzną wymiany jonów wynosi 91,1%. Otrzymany produkt zawiera 3,13 g czystego glukagonu, co oznacza 43,5% wydajności teoretycznej.

Przykład II. A. Przygotowywanie roztworu glukagonu. 4000 g wyjściowej proteiny zawierającej 144 g glukagonu rozpuszcza się w 250 litrach wodnego roztworu kwasu solnego o wartości pH 2,8 mieszając w temperaturze 25°C w ciągu 1 godziny, po czym przesącza. Do przesączu dodaje się 550 litrów wody i tyle 3n roztworu wodnego kwasu solnego, aby uzyskać wartość pH roztworu 2,1. Całkowita objętość roztworu wynosi 800 litrów.

B. Wytwarzanie włókienek. Do otrzymanego roztworu dodaje się 3,2 litra 0,1 m roztworu EDTA i 4,8 litra wodnego roztworu siarczanu amonowego o stężeniu 50% wagowych. Otrzymany roztwór o wartości pH 2,3 miesza się w ciągu 48 godzin w

temperaturze 27°C, w celu spowodowania fibrylacji. Wytworzone włókienka odwirowuje się i miesza z 120 litrami wodnego roztworu kwasu solnego o wartości pH 2,0, zawierającego 0,2% wagowo/objętościowych fenolu, po czym za pomocą 10% roztworu wodnego wodorotlenku potasowego doprowadza się wartość pH zawiesiny do 10, otrzymując 122 litry roztworu zawierającego 683,2 g wszystkich substancji stałych, co odpowiada 5,6 mg/ml. Roztwór zawiera 98,088 g glukagonu, to jest 804 µg/ml. Czystość glukagonu wynosi 14,36% i wydajność 68,12%.

C. Pośrednia krystalizacja. Wartość pH otrzymanego roztworu włókienek glukagonu doprowadza się do 7,0 za pomocą 10% wodnego roztworu kwasu fosforowego i ogrzewa do temperatury 60°C, dodając równocześnie tyle wody, aby uzyskać 137 litrów roztworu, w którym zawartość stałych substancji wynosi 5,0 mg/ml. Do roztworu dodaje się jeszcze tyle 10% wodnego roztworu kwasu fosforowego, aby uzyskać wartość pH roztworu 5,0, po czym gorący roztwór przesącza się i utrzymuje w temperaturze 5°C w ciągu 72 godzin. Krystaliczny glukagon oddziela się przez dekantację i odwirowywanie, zachowując ługi macierzyste do dalszego wykorzystania, a produkt rozpuszcza się w 9,0 litrach wodnego roztworu wodorotlenku amonowego o wartości pH 9,5 i przesącza. Przesącz zawiera 99,0 g wszystkich substancji stałych, co odpowiada stężeniu 11,0 mg/ml. Roztwór ten zawiera 42,11 g glukagonu, to jest 4,679 µg/ml. Czystość glukagonu wynosi 42,54% i wydajność 29,24%. Z otrzymanego roztworu oddziela się 1 litr, to jest 11,1% objętości roztworu i przeznaczają tę część do próby opisanej w przykładzie III, a 8 litrów poddaje się filtracji przez żel.

D. Filtrowanie przez żel. 8 litrów glukagonu podaje się na kolumnę o pięciu sekcjach, opisaną w przykładzie I D i eluuje w sposób opisany również w przykładzie I D, z prędkością przepływu 350–500 ml/minutę. Frakcja zawierająca glukagon ma objętość 30 litrów i zawiera 66,0 g wszystkich substancji stałych, to jest 2,2 mg/ml. Zawartość glukagonu wynosi 36,84 g, to jest 1228 µg/ml, czystość glukagonu 55,8% i wydajność po uwzględnieniu odjętej części roztworu wynosi 28,78%.

E. Końcowa krystalizacja glukagonu. Do frakcji zawierającej glukagon dodaje się 0,1 litra 10% roztworu kwasu fosforowego, w celu uzyskania wartości pH 7,5, po czym miesza się roztwór w temperaturze 5°C w ciągu 16 godzin, powodując krystalizację glukagonu i następnie pozostawia na okres 72 godzin. Osadzony produkt krystaliczny oddziela się przez dekantację i odwirowuje, zachowując ługi macierzyste do dalszego wykorzystania, a osad przemywa się kolejno 0,001% roztworem wodnym chlorku sodowego, bezwodnym etanolem i eterem, po czym suszy pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymuje się 33,654 g glukagonu o czystości, określonej drogą analizy aminokwasów i drogą chromatograficzną, wynoszącej 84,35%. Produkt zawiera więc 28,39 g czystego glukagonu, co stanowi 22,17% wydajności teoretycznej.

Przykład . III. Do litra roztworu włókienek glukagonu, otrzymanego w sposób opisany w przy-

kładzie II C, dodaje się około 300 ml 10% roztworu wodnego kwasu fosforowego, aż do uzyskania słabego zmętnienia i wartości pH 7,8, po czym miesza się roztwór w ciągu 2 godzin w temperaturze 25°C i następnie w ciągu 16 godzin w temperaturze 5°C i pozostawia do odstania na okres 72 godzin. Krystaliczny produkt odwirowuje się, ługi macierzysty pozostawia do wykorzystania i osad przemywa kolejno wodnym roztworem chlorku sodowego, bezwodnego etanolu i eteru, po czym suszy pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując 3,897 g glukagonu. Jego czystość oznaczona metodą analizy aminokwasów i metodą chromatograficznej wymiany jonów wynosi 81,5%, to znaczy, że produkt zawiera 3,341 g czystego glukagonu, co stanowi 21,09% wydajności teoretycznej.

Podane wyżej przykłady świadczą o tym, że sposobem według wynalazku otrzymuje się glukagon czystszy i z wyższą wydajnością niż przy stosowaniu znanego sposobu, nawet jeżeli ten znany sposób połączy się z zabiegiem filtrowania przez żel.

Rysunek ilustruje sposób opisany w przykładzie I, podając wykres przebiegu procesu eluowania w obu stadiach filtrowania przez żel. Wykres ten przedstawia zależność optycznej gęstości różnych frakcji eluatu przy długości fali 280 nm od objętości eluatu w litrach oraz zależność zawartości glukagonu w niektórych frakcjach od objętości eluatu w litrach. Tak więc wykres ten podaje zarówno zawartość protein i zawartość glukagonu w odcinku otrzymanym podczas eluowania. Z wykresu tego wynika, że glukagon jest eluowany w stosunkowo wąskim odcinku tego procesu, nawet jeżeli inne proteiny przepływają przez kolumnę w sposób ciągły.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób oczyszczania glukagonu, **znamienny tym**, że wodny roztwór glukagonu o czystości co najmniej około 0,1%, mający wartość pH od około 9 do około 11 i zawierający w 1 ml co najmniej około 0,01 mg glukagonu oraz mniej niż około 10% wagowo/objętościowych wszystkich stałych protein, podaje się na kolumnę napełnioną speczonym żelem, który w suchym stanie może ponownie pochłaniać co najmniej 4% wagowe wody i którego cząstki mają średnicę mniejszą niż około 100 mikronów, przy czym całkowita ilość glukagonu podawana na kolumnę jest taka, aby na 1 litr objętości złoża w kolumnie przypadało od około 0,01 do około 5 g glukagonu, po czym eluuje się glukagon z kolumny w temperaturze od około 4°C do około 40°C wodnym eluentem o wartości pH tego samego rzędu co wartość pH roztworu glukagonu.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się żel, który ma zdolność pochłaniania wody w ilości od około 4% do około 98% w stosunku wagowym.

3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że stosuje się żel, który ma zdolność pochłaniania wo-

dy w ilości od około 4% do około 20% w stosunku wagowym.

4. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że jako żel stosuje się usieciowany dekstran.

5. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że stosuje się żel mający zdolność pochłaniania około 5% wagowych wody.

6. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że stosuje się żel mający cząstki o średnicy od około 20 do około 80 mikronów.

7. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że obciążenie kolumny glukagonem wynosi od około 0,08 do około 3,1 g na 1 litr objętości złoża.

8. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się eluent zawierający w 1 litrze do około 0,01 mola kwasu etylenodwuamino-N,N,N',N'-czterooctowego jako środka chelatującego jon dwuwartościowego metalu.

9. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się eluent, który zawiera do około 0,5% objętościowych butanolu jako stabilizatora.

10. Sposób według zastrz. 9, **znamienny tym**, że stosuje się korzystnie eluent zawierający 0,1% objętościowych butanolu.

11. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces eluowania prowadzi się w temperaturze pokojowej.

