



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

208107

(11) (B2)

(22) Přihlášeno 10 02 75
(21) (PV 835-75)

(51) Int. Cl.³
A 61 K 37/28

(40) Zveřejněno 31 07 80

(45) Vydáno 15 05 84

(72) Autor vynálezu JACKSON RICHARD LEE, INDIANAPOLIS, INDIANA (Sp. st. a.)
(73) Majitel patentu ELI LILLY and COMPANY, INDIANAPOLIS, INDIANA (Sp. st. a.)

(54) Způsob izolování glukagonu

1

Vynález se týká způsobu izolování glukagonu z kapaliny nad sedlinou z postupu zpracovávání inzulínu krystalizací v alkalickém prostředí.

Brzy poté, kdy Banting a Best objevili inzulín v r. 1921, zaznamenalo několik skupin pracovníků, viz např. Murlin a spol., J. Biol. Chem. 56, 252 (1953) a Kimball a Murlin, J. Biol. Chem. 58, 337 (1954), že v případě několika extraktů inzulínu z pankreatu došlo k hyperglykemické odezvě. A faktor, odpovědný za tuto uvedenou hyperglykemickou odezvu, byl pojmenován glukagon.

V současné době je nejdůležitějším použitím glukagonu léčba hypoglykemie, vyvolané inzulínem. A jak vzrůstá na světě populace, postižená cukrovkou, musí rovněž i vzrůstat poptávka a potřeba glukagonu. Navíc se současně sleduje možnost použití glukagonu při srdečních poruchách. V důsledku toho znamenají tyto dvě možnosti použití zvýšenou poptávku po produkci glukagonu, přičemž nárokům lze nejlépe vyhovět zvýšením výtěžku glukagonu z přírodních zdrojů.

Prvá příprava krystalického glukagonu byla popsána v r. 1953, viz Staub a spol., Science 117, 628 (1953); rovněž Staub a spol., J. Biol. Chem. 214, 619 (1955). Jako výchozí materiál byla použita amorfni frakce, získaná během obchodní výroby inzulínu, záležející v extrakci tkáně z pankreatu okyseleným alkoholem, zahuštěním estraktu, vysrážením chloridem sodným, isoelektrickým srážením, několika frakcionacích za použití alkoholu, odbarvení, krystalizací za přítomnosti zinečnaté soli z pufru kyseliny octové s následujícím promytím, čímž se odstraní amorfni frakce a s následujícím vysušením komplexu inzulínu se zinkem, který se tímto postupem získá. Izolovaná amorfni frakce obsahuje hmotnostně asi 4 % glukagonu a asi 7 % inzulínu. Obvykle se pohybuje výtěžek amorfni frakce v rozmezí asi 5 až 10 mg

na 0,45 kg pankreatu. Další čištění glukagonu zahrnuje případně frakcionaci za hodnoty pH 6,7, frakcionaci za použití acetonu, frakční srážení za hodnoty pH 4,3, dvě frakční srážení za hodnoty pH 2,5 a 2 krystalizace z pufru močoviny a glycinu za hodnoty pH 8,6. Výtěžek krystalického glukagonu činí přitom asi hmotnostně 20 % z obsahu glukagonu v suchém amorfním materiálu, což odpovídá výtěžku asi 0,04 až 0,08 mg glukagonu na 0,45 kg pankreatu.

Zavedení krystalizace komplexu inzulinu se zinkem z pufru kyseliny citrónové, jak je to popsáno v US patentovém spise 2 626 228, znamená celkové snížení počtu stupňů, potřebných při výrobě inzulinu, používá-li se pankreas z hovězího dobytka. Ačkoliv se získává takto přibližně stejné množství amorfni frakce ve stupni promývání, jako tomu bylo u starších postupů, klesá obsah glukagonu v amorfni frakci asi na 0,2 % hmot. Bylo nalezeno, že glukagon je zadržen v pufru kyseliny citrónové během uvedené krystalizace. Izolování glukagonu z pufru kyseliny citrónové znamená vysrážení nadbytkem zinku s následujícím vysrážením solí a dvěma vysráženími za hodnoty pH 5,1 a 5,6 v tom kterém případě, čímž se odstraní zinek. Výtěžek surového glukagonu z pufru kyseliny citrónové odpovídá asi 0,8 až 0,9 mg na 0,45 kg pankreatu, přičemž výtěžek čištěného glukagonu z pankreatu odpovídá asi 0,1 až 0,3 mg na 0,45 kg pankreatu. Použití zinku ke srážení znesnadňuje dokonale odstranění zinku, přičemž se ještě zvyšuje množství inzulinu v konečném vyčištěném glukagonu.

Při studování extraktů z pankreatu bylo nalezeno, že různé okyselené alkoholové extrakty, jak se obvykle používají při výrobě inzulinu, obsahují 4 až 6 mg glukagonu na 0,45 kg pankreatu. Po koncentraci a odtučnění extraktu se snižuje obsah glukagonu na 1,5 až 2,0 mg na 0,45 kg pankreatu. Avšak, jak již to bylo uvedeno výše, lze počítat pouze s 25 až 50 % hmot. tohoto množství pro další čištění, a to v závislosti na výchozím materiálu.

Předmětem vynálezu je tedy způsob izolování glukagonu, vyznačující se tím, že se z kapaliny nad sedlinou po krystalizaci v alkalickém prostředí při výrobě inzulinu izolují proteiny s obsahem glukagonu isoelektrickým srážením za hodnoty pH od 4,2 do 6,6 nebo iontoměničovou chromatografií nebo isoelektrickým srážením s následnou frakcionací glukagonu, načež se oddělí glukagon od ostatních proteinů tvorbou glukagonových fibril za hodnoty pH v rozmezí 1,5 do 2,7 a čištění glukagonu se provádí krystalizací za pH v rozmezí od 4,5 do 8,5.

Na přiloženém schématu je výhodné provedení způsobu podle vynálezu, na němž je též patrný vztah mezi prováděním způsobu podle vynálezu a stupněm krystalizace v alkalickém prostředí při výrobě inzulinu.

Zdrojem glukagonu je kapalina nad sráženinou z krystalizačního stupně inzulinu v alkalickém prostředí, jak je to popsáno v US patentu č. 3 719 655. Uvedenou kapalinou je vodný roztok o hodnotě pH 7,2 až 10,0 s koncentrací kationtů 0,2 až 1,0 M a s rozpuštěnými proteiny, z čehož přibližně 1 až 10 % je inzulin a 0,2 až 1,5 % glukagon v závislosti na pankreatu, použitém při výrobě inzulinu. Například při použití pankreatu z hovězího dobytka obsahuje kapalina nad sedlinou po krystalizaci v alkalickém prostředí protein, z něhož přibližně 5 až 10 % je inzulin, 1,0 až 1,5 % glukagon. Při použití pankreatu z vepřů obsahuje protein z kapaliny nad sedlinou obvykle asi 1 až 2 % inzulinu a asi 0,2 až 0,3 % glukagonu. Je však třeba poznamenat, že skutečný výtěžek glukagonu od várky k várce může značně kolísat, a to v širokém rozmezí v důsledku snadné degradace glukagonu působením enzymů.

Oddělení proteinu, obsahujícího glukagon, z kapaliny nad sedlinou po alkalické krystalizaci představuje první stupeň postupu. Obecně řečeno se dá oddělení docílit jakýmkoli známým postupem, např. se může hodnota pH kapaliny nad sedlinou upravit asi na 3,0, načež se přidáním chloridu sodného v množství 20 % hmot. vysráží glukagon a další proteiny. Jinak se dá vysrážení docílit přidáním nadbytku chloridu zinečnatého za hodnoty pH asi 6,0. Třetí postup zahrnuje použití isoelektrického vysrážení. A ještě další postup zahrnuje použití

iontoměničové chromatografie. Druhým stupněm postupu je dělení glukagonu od ostatních proteinů. Toto dělení se dá v podstatě provádět jakýmkoli známým postupem, jako je gelová filtrace, iontoměničová chromatografie, isoelektrické vysrážení a tvorba glukagonových fibril, přičemž z těchto právě zmíněných postupů je nejvýhodnější tvorba glukagonových fibril.

Třetím a konečným stupněm postupu je čištění glukagonu, získaného ve druhém stupni. Obecně se dá čištění provádět jakýmkoli známým způsobem, jak to odborníci znají, jako je krystalizace, iontoměničová chromatografie a podobně. Krystalizace je výhodným postupem.

Použití isoelektrického srážení nebo iontoměničové chromatografie, nebo kombinace těchto dvou postupů je výhodným postupem pro oddělování proteinů s obsahem glukagonu z kapaliny nad sedlinou po alkalické krystalizaci. Obecně vyžaduje isoelektrické srážení, aby hodnota pH kapaliny nad sedlinou byla v rozmezí od asi 4,2 do asi 6,6. Výhodný rozsah pH je od asi 4,6 do asi 5,2, přičemž nejvýhodnějším rozmezím je rozsah od asi 4,7 do asi 5,9.

Protože kapalina nad sedlinou po alkalické krystalizaci má hodnotu pH od asi 7,2 do asi 10, je třeba tuto kapalinu okyselit na žádoucí hodnotu pH. Okyselením je obvykle přidání zředěného roztoku anorganické nebo organické kyseliny, jež neodbourává glukagon, aniž s ním reaguje. Mezi příklady vhodných kyselin patří kyselina chlorovodíková, fosforečná, mravenčí, octová, propionová a podobné. Za výhodnou kyselinu třeba označit kyselinu chlorovodíkovou.

Případně a s výhodou se může přidat objemově asi 20 % alkoholu, čímž se sníží rozpustnost proteinů, obsahujících glukagon, v kapalině nad sedlinou po alkalické krystalizaci. Výraz "alkohol" znamená nasycený alifatický jednosytný alkohol nejvýše s pěti atomy uhlíku, s výhodou nejvýše se třemi atomy uhlíku, jako je metylalkohol, etylalkohol, propylalkohol a isopropylalkohol, přičemž nejvýhodnějším je etylalkohol. Použije-li se takový alkohol, pak se obvykle přidává do kapaliny nad sedlinou před okyselením.

Po okyselení kapaliny nad sedlinou na žádoucí hodnotu pH dojde k vysrážení proteinu s obsahem glukagonu obvykle během několika minut. K dosažení úplného vysrážení se nechá roztok stát, obvykle za teploty nejvýše 20 °C. S výhodou se roztok ochladí na teplotu od asi 3 do asi 10 °C. Ačkoliv je srážení skončeno zpravidla do 24 hodin, může se směs nechat stát jakkoli dlouho, aniž by to mělo škodlivý vliv.

Po skončeném srážení se sraženina, která se zde nadále označuje jako isoelektrická sraženina, izoluje jakýmkoli známým postupem, jako je odstředění nebo filtrace; výhodným postupem je obvykle filtrace. Takto získanou isoelektrickou sraženinu netřeba promývat nebo sušit, ačkoliv se mohou tyto postupy použít, je-li to třeba.

Dalším postupem, který se hodí k oddělení proteinů, obsahujících glukagon, z kapaliny nad sedlinou po krystalizaci v alkalickém prostředí, je iontoměničová chromatografie. Z popsaných postupů tohoto druhu je zvláště účinný, a proto i zvláště výhodný postup, popsaný v US patentovém spise 3 715 345. Krátce řečeno je postup iontoměničové chromatografie založen na průtoku roztoku, obsahujícího glukagon, přes pryskyřici, kterou je sulfonovaný makroretikulární kopolymer styrénu a divinylbenzenu, v cyklu alkalického kovu, a to za pH hodnoty 7 až 8. Glukagon se adsorbuje na pryskyřici a eluuje se potom zředěným roztokem báze, jako je 0,1 N roztok amoniaku. Eluát s obsahem glukagonu se okyselí na hodnotu pH 2,5 a glukagon se vysráží za použití běžného postupu vysolení. Vzniklá sraženina, obsahující glukagon se tím v podstatě oddělí od inzulinových proteinů, ale sraženina stále ještě obsahuje jiné neglukagonové materiály.

Zpracuje-li se kapalina nad sedlinou po krystalizaci inzulinu v alkalickém prostředí za použití postupu z US patentového spisu 3 715 345, získá se eluát, obsahující inzulin a pevný podíl, kterou tvoří sůl s obsahem glukagonu. Eluát s obsahem inzulinu lze recyklo-

vat do postupu výroby inzulínu, je-li to vhodné. Pevný podíl soli s obsahem glukagonu se pro další zpracování znovu rozpustí; pro jednoduchost se pH roztoku a koncentrace proteinu obvykle upraví na přibližně stejnou hodnotu, jako tomu bylo v případě kapaliny nad sedlinou po krystalizaci v alkalickém prostředí.

Často může být výhodné provádět první stupeň postupu, to jest oddělování proteinů s obsahem glukagonu z kapaliny nad sedlinou po krystalizaci v alkalické oblasti, isoelektrickým srážením s následující iontoměničovou chromatografií vzájemně po sobě. Například lze kapalinu nad sedlinou z krystalizace v alkalickém prostředí zpracovávat iontoměničovou chromatografií. Přitom se pevný podíl soli s obsahem glukagonu, jak se získá, znovu rozpustí a zpracuje isoelektrickým srážením, jak je to zde výše popsáno. Pro obměnu se kapalina nad sedlinou po krystalizaci v alkalickém prostředí zpracuje isoelektrickým srážením, tímto způsobem získaná sraženina se může rozpustit v slabě alkalickém vodném prostředí, a roztok se zpracuje iontoměničovou chromatografií. V každém případě je možno recyklovat eluát s obsahem inzulínu z iontoměničové chromatografie, je-li to třeba, do postupu zpracovávání inzulínu.

Jak to zde již bylo výše uvedeno, je výhodným způsobem oddělování glukagonu od dalších proteinů tvorba glukagonových fibril. Obecně se tvorba glukagonových fibril provádí v okyseleném vodném roztoku. Obvykle se proteiny s obsahem glukagonu rozpustí v okyseleném, vodném prostředí o pH nižším, než asi 2,7. I když hodnota pH může obvykle kolísat v rozmezí od asi 1,5 do asi 2,7, lze jako výhodné rozmezí hodnot pH označit rozmezí od asi 2,0 do asi 2,5. A sčkoliv se dá použít kterékoli z kyselin, které jsou vhodné k použití při okyselování kapaliny nad sedlinou po krystalizaci v alkalickém prostředí před použitím isoelektrického srážení, je znovu třeba označit kyselinu chlorovodíkovou za výhodnou. Za použití kyseliny chlorovodíkové je však třeba použít konzervační činidlo, jako je fenol, obvykle v koncentraci asi 0,2 %, počítáno jako hmotnost na objem. Při typickém provedení se protein, obsahující glukagon, rozpustí v 0,01 N roztoku kyseliny chlorovodíkové s obsahem 0,2 % fenolu, míněno hmotnost na objem.

Koncentrace proteinů s obsahem glukagonu v roztoku může obvykle kolísat v rozmezí od asi 2,5 do asi 30 mg/ml. Výhodné rozmezí činí od asi 5 do asi 20 mg/ml, a nejvýhodnější rozmezí činí od asi 5 do asi 10 mg/ml.

Případně se může přidat do okyseleného roztoku proteinu, obsahujícího glukagonu, anorganická sůl, rozpustná ve vodě, čímž se iniciuje tvorba fibril. Výraz "rozpustná sůl" znamená anorganickou sůl, jež je rozpustná ve vodě za koncentrace, použité jak to zde bylo výše popsáno. Protože se má za to, že anorganická sůl má primární vliv vysolením na iniciaci tvorby fibril, nemá volba anorganické soli rozhodující význam. V praxi však použití radioaktivních, jedovatých nebo barevných solí, nebo solí, které se vyznačují oxidačními účinky, případně které jsou redukujícími činidly, či jsou silně kyselé nebo zásadité, není žádoucí pro zcela jasné důvody. Takže mezi vhodné anorganické soli obvykle patří amonné soli, rozpustné ve vodě, dále soli alkalických kovů, rozpustné ve vodě, jakož i soli prvků až do šesté skupiny periodického systému, jakož i soli kovů žiravých zemin, rozpustné ve vodě a obsahující i prvky šesté skupiny periodické soustavy. Jako příklady takových solí lze uvést kromě jiných bromid amonný, chlorid amonný, fluorid amonný, jodid amonný, síran hořečnatamonný, síran manganatoamonný, dusičnan amonný, síran amonný, bromid lithný, chlorid lithný, fluorokřemičitan lithný, fluorosulfonan lithný, jodid lithný, molybdenan lithný, dusičnan lithný, síran lithnodraselný, fosforečnan sodno-amonný, síran sodno-amonný, bromid sodný, chlorid sodný, jodid sodný, hexafluorofosforečnan sodný, natriumfluorsulfonát, síran hořečnatosodný, dusičnan sodný, hexametafosforečnan sodný, prim.-orthofosforečnan sodný, sek.orthofosforečnan sodný, kyselý síran sodný, bromid draselný, chlorid vápenatodraselný, chlorid draselný, fluorid draselný, jodid draselný, chlorid-síran hořečnatodraselný, síran hořečnatodraselný, chlorid hořečnatodraselný, molybdenan draselný, orthofosforečnan draselný, síran sodnodraselný, bromid rubidný, chlorid rubidný, fluorid rubidný, jodid rubidný, dusičnan rubidný, bromid cesný, chlorid cesný, fluorid cesný, jo-

did cesný, dusičnan cesný, síran cesný, bromid berylnatý, chlorid berylnatý, fluorid berylnatý, dusičnan berylnatý, orthofosforečnan berylnatý, bromid hořečnatý, chlorid hořečnatý, jodid hořečnatý, dusičnan hořečnatý, silikofluorid hořečnatý, bromid vápenatý, chlorid vápenatý, jodid vápenatý, dusičnan vápenatý, bromid strontnatý, chlorid strontnatý, jodid strontnatý, bromid barnatý, jodid barnatý, dále jejich odpovídající hydráty, rozpustné ve vodě a podobně. Jako výhodné soli je možno označit soli amonné, přičemž nejvýhodnější soli je síran amonný. Vhodné anorganické soli se mohou obvykle použít v koncentraci až asi do 0,5 M. S výhodou se mohou takové soli použít v koncentracích od asi 0,01 do asi 0,05 M.

Rozmezí teplot, kdy dochází k tvorbě glukagonových fibril, je obvykle v rozmezí od asi 20 do asi 30 °C. Výhodnou teplotou je rozmezí od asi 24 do asi 26 °C a nejvýhodnější teplotou je 25 °C.

Tvorba fibril, čemuž se obvykle napomáhá mícháním, začíná zpravidla asi za 3 až 4 hodiny od doby přípravy kyselého, vodného roztoku glukagonu a je skončena asi za 48 hodin. Doby nad asi 48 hodin obvykle nejsou nutné.

Po skončení tvorby fibril se mohou vzniklé fibrily izolovat jakýmkoli ze známých postupů, jako je filtrace nebo odstředění, přičemž posléze uvedený postup lze označit za výhodný. Je-li to žádoucí, pak se glukagonové fibrily mohou promýt suspendováním fibril v okyseleném vodném prostředí, které případně může obsahovat anorganickou sůl. Teplota promývacího prostředí může být v rozmezí od asi 20 do asi 30 °C, přičemž za výhodnou teplotu lze označit 25 °C. Fibrily se potom jímají, jako předtím, a uchovávají se za chladu, obvykle za teploty pod asi 10 °C, pokud se příští stupeň neprovádí ihned bezprostředně.

Je-li to žádoucí, pak se může do prostředí, kde vznikají fibrily, přidat chelatační činidlo, jako je kyselina etylendiamintetraoctová. Koncentrace chelatačního činidla činí obvykle do asi 0,01 M, přičemž za výhodnou koncentraci lze označit 0,004 M. Avšak použití chelatačního činidla není výhodné, pokud nejsou současně v roztoku ionty zinku nebo ionty jiných dvojmocných kovů.

Jak to již bylo zde výše uvedeno, je krystalizace výhodným způsobem čištění glukagonu, jak se získá při oddělování od ostatních proteinů. Obecně se krystalizace glukagonu provádí rozpouštěním glukagonu v alkalizovaném vodném prostředí s tím, že se toto prostředí okyselí do mírně alkalické nebo kyselé oblasti, čímž se iniciuje krystalizace, což znamená, že pH má být v rozmezí hodnot od asi 4,5 do asi 8,5.

Rozpuštění glukagonu se dá provést dvěma způsoby; za prvé je možno glukagon rozpustit přímo v alkalickém vodném prostředí nebo se může glukagon suspendovat v destilované vodě a hodnota pH se upraví přidáním vodného roztoku báze. Jako vhodné báze lze obecně označit hydroxidy alkalických kovů, a amoniak, přičemž za výhodnou sloučeninu je třeba označit hydroxid draselný.

Obecně může mít takto připravený roztok glukagonu pH v rozmezí od asi 9,0 do asi 11,5, přičemž za výhodné rozmezí lze označit rozsah od asi 9,5 do asi 10,5.

Koncentrace glukagonu v alkalickém roztoku má být v rozmezí od asi 2 do asi 10 mg/ml. Za výhodnou koncentraci lze označit rozmezí od asi 4 do asi 8 mg/ml, přičemž nejvýhodnější koncentrací je asi obsah 5 mg/ml.

Protože výsledkem okyselení je často bezprostřední vysrážení malého množství neglukagonových proteinů, pak dále uvedený postup okyselení, ačkoliv není podstatný, je výhodný.

Alkalický roztok glukagonu se zahřeje na teplotu od asi 55 do asi 65 °C, potom se tento roztok okyselí na pH od asi 4 do asi 6 přidáním 10% kyseliny fosforečné. Ačkoliv se

může použít kterákoli z kyselin, použitelných v předchozím stupni, je výhodné použití právě kyseliny fosforečné. Vzniklý roztok se potom filtruje za udržování stále ještě na zmíněné vyšší teplotě. Obecně řečeno je tento stupeň filtrace pouze případný a často se dá opomenout, je-li podíl sraženiny, vznikající při okyselení minimální. Dále pak se mohou použít, je-li to žádoucí, i jiné postupy místo filtrace, například odstředění.

Odbarvuje-li se glukagonový roztok, přidává se aktivní uhlí buď před okyselením, nebo po okyselení, s výhodou před.

Po okyselení a případné filtraci, byla-li použita, se nechá glukagonový roztok stát za teploty v rozmezí od asi 2 do asi 10 °C a krystaluje po dobu asi 24 až asi 120 hodin. Výhodnou teplotou jsou 4 °C, a s výhodou se pohybuje doba krystalizace od asi 72 do asi 120 hodin, nejvýhodněji činí krystalizační doba 72 hodin.

Největší podíl kapaliny nad sedlinou se dekantuje od vyloučených krystalů glukagonu, obvykle přes filtr. Zbývající podíl kapaliny nad sedlinou se oddělí od krystalů glukagonu obvykle odstředěním. Vyčištěný glukagon se potom postupně promývá zředěným roztokem chloridu sodného (obvykle 0,001%) a vodou, potom se lyofilizuje a uchovává za chladu.

V závislosti na čistotě glukagonu ze stupně oddělování od ostatních proteinů, tj. z druhého stupně (B) a v závislosti na žádoucí čistotě konečného produktu se může použít navíc jedna další nebo i několik krystalizací. Bylo však nalezeno, že celkem 2 krystalizace obvykle dostačují k získání glukagonu o čistotě nejméně 80%, vztaženo na biologické testy na kočkách.

Použijí-li se 2 krystalizace, je výhodný tento dále uvedený postup: Prvá krystalizace se provede, jak je to popsáno zde výše a krystaly se rozpustí v alkalickém roztoku. Při druhé krystalizaci se provede okyselení na pH od asi 7,0 do asi 8,5, s výhodou od asi 7,3 do asi 7,5 a nejvýhodněji asi na 7,4. Rozpouštění a postup filtrace, pokud se provádí, se s výhodou provede za teploty od asi 35 do asi 45 °C, nejvýhodněji za teploty asi 40 °C. Koncentrace glukagonu činí přitom nejvýhodněji asi 10 mg/ml.

Je-li to žádoucí, může se kapalina nad sedlinou z kterékoli krystalizace nebo i ze všech recyklovat. Např. veškerý podíl případně obsaženého proteinu se může ze zmíněné kapaliny nad sedlinou vysrážet úpravou pH za použití zředěné kyseliny chlorovodíkové do rozmezí 2,5 až 1,0 s následujícím přidáním 20% chloridu sodného, míněno hmotnost na objem. Získaná sraženina se může použít v prvním stupni postupu podle tohoto vynálezu buď odděleně, nebo po rozpuštění v alkalické kapalině nad sedlinou po krystalizaci.

Jak to již zde bylo dříve uvedeno, obsahuje obvykle alkalická kapalina nad sedlinou po krystalizaci v roztoku podstatně více inzulínu než glukagonu. Zmíněný podíl inzulínu je složkou proteinů, obsahujících glukanon, jak se tyto proteiny získají isoelektrickým srážením. Ačkoliv se v druhém stupni postupu, tj. při oddělování glukagonu od ostatních proteinů, oddělí skutečně účinně glukagon od inzulínu, může se postup dělení jevit jako velmi škodlivý pro inzulínovou složku směsi proteinů. V důsledku toho je často žádoucí provádět první stupeň postupu za použití iontoměničové chromatografie, což dovoluje rovněž oddělení inzulínu od glukagonu.

Je třeba zdůraznit, že však iontoměničová chromatografie není jedinou možností oddělování inzulínu od glukagonu před oddělováním glukagonu od ostatních proteinů. Např. se může sraženina po isoelektrickém srážení zpracovávat postupem, který je označován jako frakcionace hyperglykemického faktoru. Krátce řečeno záleží tento postup ve vysolování glukagonu z mírně alkalického, fenol-vodného prostředí. Frakcionování hyperglykemického faktoru popisuje Staub se spolupracovníky, viz výše. Kapalina nad sedlinou, obsahující inzulín, se recykluje do postupu čištění inzulínu, zatímco vysrážený surový glukagon se použije ve druhém stupni tohoto postupu.

Ačkoliv to pro postup podle tohoto vynálezu není podstatné, je výhodné, aby kapalina nad sedlinou ze stupně tvorby fibril byla recyklována do inzulinového postupu, obvykle do začátku stupně alkalické krystalizace, jak je to popisováno v US patentovém spise číslo 3 719 655. Pochopitelně není takové recyklování nutné, byl-li oddělen inzulin od glukagonu, jak je to popisováno zde výše, před vlastní tvorbou fibril. V takovém případě však se recykluje takto oddělený inzulin do inzulinového postupu.

Postup podle tohoto vynálezu a jeho vztah k inzulinovému postupu snad bude lépe pochopitelný s odkazem na vyobrazení, jímž je schéma jednoho provedení postupu podle tohoto vynálezu. Pro jednoduchost jsou kapaliny, získané jako podíl nad sedlinou z prvního a třetího stupně tohoto postupu zakresleny, jako by nebyly k potřebě, přičemž je samozřejmé, že tyto kapaliny mohou být recyklovány, jak je to zde popsáno výše.

Postup krystalizace v alkalickém prostředí podle US patentového spisu 3 715 655 je vyznačen v nejvyšší části schématu 1. Při tomto postupu se získá alkalická nebo amonná sůl inzulinu 6 a supernatant 2. Části inzulinového postupu jsou označeny přerušovanou čarou 7. Všechno, co se nachází mimo oblast přerušované čáry 7 tvoří glukagonový postup.

K tomuto postupu se užije supernatant 2, z něhož se získá isoelektrická sraženina 2. Zbývající supernatant 2 se odvádí do odpadu 10. Dále se získají fibrily 3 glukagonu a krystalický glukagon 4. Supernatant 11 z krystalizace glukagonu se odvádí do odpadu 12.

Teplotní hodnoty jsou uváděny ve stupních Celsia.

P ř í k l a d 1

Kapalina nad sedlinou po krystalizaci v alkalickém prostředí ze zpracování 5 750 kg pankreatu ze skotu a vepřů o objemu 14,75 litrů a s obsahem pevných látek 40,7 mg/l se zředí přidáním 1,45 litrů absolutního etanolu. Přidáním roztoku kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 3 N se upraví pH vzniklého roztoku na hodnotu 5,2 a roztok se chladí přes noc na teplotu 5 °C. Vzniklá sraženina se odfiltruje, rozpustí se v 11,28 litrech 0,01 N roztoku kyseliny chlorovodíkové, obsahující 0,2 % fenolu (hmotnost na objem, o této směsi se zde nadále mluví jako směs kyseliny, fenolu a vody), a testováním získaného roztoku byly zjištěny tyto hodnoty:

celkový obsah pevných podílů:	512,6 g (45,4 mg/ml)
inzulin:	87,43 jednotek/ml (1,93 jednotek/mg pevných podílů)
glukagon:	463,7 µg/ml (1,02 % z pevných podílů).

Pro testování se oddělí z roztoku část 870 ml s tím, že zbude 10,4 litrů roztoku, obsahujícího asi 473 g pevných podílů.

Při provádění frakcionace hyperglykemického faktoru se výše uvedený roztok zředí přidáním 111,8 litrů směsi kyseliny, fenolu a vody na celkový objem 122,2 litrů (obsah pevných podílů činí potom 0,387). Ke zředěnému roztoku se přidá 245,8 ml ztekuceného fenolu, 941 g chloridu sodného a dostačující množství 40% vodného roztoku hydroxidu sodného k úpravě pH na hodnotu 9,0 se zřetelem na rozpouštění všech pevných podílů. Potom se hodnota pH upraví přidáním 3 N roztoku kyseliny chlorovodíkové na 7,5 a získaný roztok se chladí 1 až 2 dny na 5°. Během té doby se vyloučí sraženina, kapalina nad sedlinou se dekantuje a zbytek se odsaje. Sraženina se navíc odstředí, pevné podíly z filtrace a odstředění se spojí a vše se rozpustí v 10 litrech okyselené fenolové vody. Testováním roztoku se získají tyto hodnoty:

celkový obsah
pevných podílů: 75,0 g (7,5 mg/ml)
inzulín: 6,33 jednotek na ml
glukagon: 275 µg/ml (5,01 % veškerých pevných podílů)

Roztok se zředí na koncentraci pevných podílů 5,0 mg/ml přidáním dalších 5 litrů směsi kyseliny, fenolu a vody a z takto připraveného roztoku se oddělí 5,0 litrů k testování, čímž zůstane 10,0 litrů roztoku, obsahujícího asi 50 g pevných podílů.

K tomu zbývajícimu roztoku se přidá za míchání 8,0 ml 0,5 M vodného roztoku kyseliny etyléndiamintetraoctové ve formě tetrasodné soli a 60 ml 50% vodného roztoku síranu amonného. V míchání se pokračuje 16 hodin za teploty místnosti, fibrily glukagonu, které přitom vzniknou, se po odstředění promyjí dvakrát směsí kyseliny, fenolu a vody, obsahující kyselinu etyléndiamintetraoctovou a síran amonný, jako zde výše.

Glukagonové fibrily se suspendují v 10 litrech vody, obsahující podle hmotnosti 0,2 % fenolu na objem vody. Směs se vyhřeje na 40°, pH se upraví na hodnotu 10,5 přidáním 150 ml 10% vodného roztoku hydroxidu draselného, načež se roztok vyhřívá na 60° a pH se upraví na hodnotu 7,8 přidáním 68 ml 10% roztoku kyseliny fosforečné. Jakmile se dosáhne teploty 60°, pH se dále sníží na hodnotu 5,0 přidáním dalšího podílu 68 ml 10% roztoku kyseliny fosforečné, načež se roztok ještě za horka filtruje bez odsávání a filtrát se za míchání vychladí. Chlazení na 5° se provádí po 72 hodin a vysrážený glukagon se odfiltruje. Takto získaný pevný podíl se rozpustí, jak je to uvedeno zde výše pro glukagonové fibrily, avšak po úpravě pH na hodnotu 10,5 činí celkový objem 870 ml. Roztok se vyhřeje na 60°, pH se upraví na hodnotu 5,0 přidáním 10% roztoku kyseliny fosforečné a vzniklý roztok se ještě za horka filtruje bez odsávání. Filtrát se vychladí za míchání, jak je to popsáno výše. Vysrážený glukagon se odstředí a lyofilizuje, výtěžek glukagonu činí 1,84 g. Odpovídá to 74 %, přepočteno na glukagon, obsažený ve směsi před tvorbou fibril a 39 % glukagonu, obsaženého ve směsi po srážení proteinů z kapaliny nad sedlinou po krystalizaci v alkalickém prostředí (pro tato zjištění byly odebírány vzorky).

P ř í k l a d 2

Matečné louhy po krystalizaci v alkalickém prostředí ze 3 krystalizací inzulínu za použití 28 365,5 kg, 36 902,7 kg a 48 778,6 kg směsi pankreatu z hovězího dobytka a prasat v poměru 2:1 se odstředí od krystalů inzulínu. Objem zmíněných matečných louhů činí v tom kterém případě 460, 515 a 680 litrů a tyto podíly se zředí přidáním 51, 57,2 a 75,5 litrů absolutního etanolu v tom kterém případě, ve všech případech se provede okyselení na pH 5,0 přidáním 3 N roztoku kyseliny chlorovodíkové, a po 15minutovém míchání se reakční směsi vychlazují nejméně 24 hodin. Testy matečných louhů před vysrážením a roztoky sraženin:

1. 1 150 µg glukagonu a 228 jednotek inzulínu na 0,45 kg původního pankreatu v matečném louhu; 839 µg glukagonu a 291 jednotek/0,45 kg původního pankreatu, 59,7 mg pevných podílů na 0,45 původního pankreatu v roztoku sraženiny, objem 158 litrů;

2. 736 µg glukagonu a 139 jednotek inzulínu na 0,45 původního pankreatu v matečném louhu; 345 µg glukagonu a 123 jednotek inzulínu na 0,45 kg původního pankreatu, jakož i 27,8 mg pevných podílů na 0,45 kg původního pankreatu v roztoku sraženiny, objem 150 litrů;

3. 1 214 µg glukagonu a 218 jednotek inzulínu na 0,45 kg původního pankreatu v matečném louhu a 946 µg glukagonu a 191 jednotek inzulínu na 0,45 kg původního pankreatu, jakož i 59,0 mg pevných podílů na 0,45 kg původního pankreatu v roztoku sraženiny o objemu roz-

toku 156 litrů. Sraženiny byly odfiltrovány a rozpuštěny ve směsi kyseliny, fenolu a vody, připravené postupem podle příkladu 1.

Roztoky byly smíchány za vzniku 464 litrů roztoku o obsahu 12 570 g pevných podílů; zředěním za použití 630 litrů směsi kyseliny, fenolu a vody se získá roztok s obsahem 2 % pevných podílů, načež se pH upraví na hodnotu 2,1 dalším přidáním 3 N roztoku kyseliny chlorovodíkové. K roztoku se přidá 0,3 % síranu amonného ve formě 50% roztoku (6 mg na litr, tedy celkem 3 780 ml) a vše se míchá 24 hodin při 25° za současně tvorby fibril, načež se reakční směs ponechá stát 48 hodin při 15°. Glukagonové fibrily se odstředí od zbylého roztoku a kapalina nad sedlinou se testuje (obsahuje 222 μ g glukagonu a 114 jednotek inzulinu na 0,45 kg původního pankreatu), načež se recykluje do zpracování inzulinu. Fibrily glukagonu se suspendují do 450 litrů studené vody, obsahující 0,2 % fenolu, k suspenzi se přidá 2 700 ml 50% roztoku síranu amonného a reakční směs se pomalu míchá 30 minut k promytí fibril, které se znovu odstředí (kapalina z promývání není k potřebě). Glukagonové fibrily se suspendují v 275 litrech vody, obsahující 0,2 % fenolu a pH se upraví na hodnotu 3,85 za použití 10% kyseliny fosforečné. Testováním se zjistí: obsah pevných podílů 5,48 mg na 0,45 kg původního pankreatu (0,52%), tj. 1 404 g z původních 115 047 kg původního pankreatu. Obsah glukagonu: 212 μ g/0,45 kg původního pankreatu, celkem 54,2 g.

275 litrů suspenze fibril glukagonu se rozdělí na 2 části, a to 1. 135 litrů a 2. 140 litrů pro provedení první krystalizace. První podíl se zředí přidáním 140 litrů 0,2% fenolové vody za vzniku roztoku o koncentraci 0,5 %. Další podíl se ponechá za obsahu pevných látek 0,52 %. Každá z fibrilových suspenzí se vyhřeje na 60° a hodnota pH se upraví na 9,0 až 11,0, tedy konkrétně v případě 1. na 9,9 a v případě 2. na 9,7 za použití 10% vodného roztoku hydroxidu draselného. Výsledkem je čirý roztok. Přidá se 281 g aktivního uhlí (Norit A, 0,4 g na g pevných podílů) a po desetiminutovém míchání se hodnota pH roztoku znovu upraví na 5,0 přidáním 10% roztoku kyseliny fosforečné. Reakční směs se ještě za horka filtruje přes nuč s filtračním papírem ED č. 613. Filtrát (krystalizační roztok) se dále pomalu míchá 16 až 20 hodin za chlazení na 4°, čímž se podporuje jednotná krystalizace glukagonu. Sraženina, jež se oddělí za hodnoty pH 5,0 při 60° se dále zpracovává k získání dalšího podílu krystalického glukagonu suspendováním sraženiny v 120 litrech 0,2% fenolové vody za koncentrace pevných podílů 0,5 % (test pevných látek: 8,0 g) s tím, že se suspenze vyhřeje na 60°, pH se upraví na hodnotu 10,0, tím se pevné podíly rozpustí, vše se míchá 10 minut a hodnota pH se znovu upraví na 5,0 přidáním 10% roztoku kyseliny fosforečné; ještě za horka se reakční směs filtruje bez odsávání. Filtrát se pomalu míchá 16 až 20 hodin za chlazení na 4°, přičemž krystalizace je skončena za 72 až 120 hodin.

Druhá sraženina za hodnoty pH 5,0 není k potřebě. Vlastní podíl matečných louhů po krystalizaci z první a druhé krystalizační směsi se po dekantaci přefiltruje za odsávání, k prvnímu matečnému louhu se přidá 20% roztok chloridu sodného v takovém množství, aby se vysrážel jakýkoli podíl glukagonu, který nevykrystaloval. Tyto sraženiny se smíchají s dalšími podobnými podíly a znovu se zpracují za přesrážení při pH 4,6 s další krystalizací za vzniku dalšího podílu krystalů glukagonu. Glukagonové krystaly z prvních dvou podílů, představující první výtěžek a krystaly z následujícího zpracování spojených sraženin po první krystalizaci představují druhý výtěžek; vše se spojí dohromady, odstřeďuje 3 minuty, tím se oddělí matečné louhy a potom se pevný podíl přepraví do lyofilizačních zásobníků za použití vody jako prostředí k suspendování a lyofilizuje se. Krystaly glukagonu po prostřední krystalizaci se zváží a vzorky se testují. Krystaly glukagonu z prostředí krystalizace: výtěžek, 1. podíl: 1. 41,0 g (čistota 91,7%) a 2. 44,0 g (čistota 86,8%), což odpovídá 85,0 g glukagonu o čistotě 89,1%, tedy 75,8 g čistého glukagonu, tj. 292 μ g na 0,45 kg původního pankreatu, nebo 332 μ g/0,45 kg původního pankreatu ve stavu glukagonu, jak byl izolován.

Prvé následující zpracování krystalů (druhý výtěžek): 19,0 g (čistota 100%), 75 μ g na 0,45 kg původního pankreatu, přepočteno tedy jak na čistý produkt, tak na produkt získaný. Druhé zpracování krystalů (první matečný louh), výtěžek 22,0 g (čistota 46%) nebo

9,9 g čisté látky, tj. 39 μ g na 0,45 kg původního pankreatu (přepočteno na čistou látku) nebo 85 μ g na 0,45 kg původního pankreatu, počítáno na látku, jak byla izolována. Celkový výtěžek 126,0 g. Obsah pevných podílů: 126,0 g (476 μ g na 0,45 kg původního pankreatu), čistota 83,1% nebo 104,7 g glukagonu čistého (409 μ g na 0,45 kg původního pankreatu).

Překrystalování bylo provedeno ve spojitosti s dalšími krystaly prostředních krystalizací, jak se tyto frakce nahromadily. Konečné krystaly glukagonu představují podle hmotnosti 85 % hmotnosti použitých krystalů. Překrystalování bylo prováděno za hodnoty pH 7,5 po rozpuštění získaných krystalů za hodnoty pH 8,0 až 10,0 v 10% vodném roztoku hydroxidu draselného při 40°, za obsahu pevných podílů 1,0 % s následující úpravou pH na hodnotu 7,5 přidáním 10% roztoku kyseliny fosforečné s následující filtrací a ochlazením. Konečné krystaly se izolují odstředěním po dekantování hlavního podílu matečné kapaliny (jež byla recyklována do další krystalizace), promytím dvakrát za použití 0,001% roztoku chloridu sodného, dále promytím studenou vodou a lyofilizováním. Vypočtený výtěžek činí 89,0 g nebo 348 μ g na 0,45 kg původního pankreatu a výtěžek regenerace z alkalických matečných louch po krystalizaci činí 33,2 %.

P ř í k l a d 3

Matečný louch po krystalizaci v alkalickém prostředí v množství 425 litrů o pH 7,5 s obsahem 65 μ g/ml glukagonu se nechá projít iontoměničovou pryskyřicí, sestávající ze soli sulfonovaného makromolekulárního kopolymeru styrenu a divinylbenzenu s alkalickým kovem nebo kovem alkalických zemin (Amberlite 200).

630 litrů frakce s obsahem glukagonu obsahuje v 4 047 g pevného podílu 33,6 g glukagonu. Alikvotní část této frakce o objemu 32 litrů se zahustí na objem 4,38 litrů při pH 3. K tomuto koncentrátu se přidává hydroxid draselný tak dlouho, až se dosáhne pH 9,5. Výsledný roztok obsahuje v 82,5 g pevného podílu 1,3 g glukagonu.

Polovina koncentrátu, obsahující 0,65 g glukagonu se upraví na pH 2,1 přidáváním zředěné kyseliny chlorovodíkové s následným přidáním fenolu v množství 2,2 ml/l, sodné soli kyseliny etyléndiamintetraoctové o koncentraci 0,1 M v množství 4 ml/l a 50% síranu amonného v množství 6 ml/l. Směs se pak míchá při teplotě místnosti dva dny.

Vzniklé glukagonové fibrily se oddělí od matečného louchu odstředěním. Matečný louch obsahoval 0,42 g glukagonu. Frakce fibril se rozpustí ve zředěném roztoku hydroxidu draselného za vzniku 212 ml roztoku s obsahem 1,89 g pevného podílu a 0,307 g glukagonu.

Roztok se zahřívá na teplotu 60° a pH se upraví na 5,0 přidáním kyseliny chlorovodíkové. Pak se roztok zchladí na 5° na dobu 72 hodin. Sraženina se oddělí filtrací. Matečný louch obsahuje 0,004 g glukagonu. Sraženina sestává ze 1,35 g pevného podílu s obsahem 0,157 g glukagonu. Výtěžek je 24 %.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob izolování glukagonu, vyznačující se tím, že se z kapaliny nad sedlinou po krystalizaci v alkalickém prostředí při výrobě inzulínu izolují proteiny s obsahem glukagonu isoelektrickým srážením za hodnoty pH od 4,2 do 6,6 nebo iontoměničovou chromatografií nebo isoelektrickým srážením s následnou frakcionací hyperglykemického faktoru, načež se oddělí glukagon od ostatních proteinů tvorbou glukagonových fibril za hodnoty pH v rozmezí od 1,5 do 2,7 a čištění glukagonu se provádí krystalizací za pH v rozmezí od 4,5 do 8,5.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se isoelektrické srážení provádí za přítomnosti objemově až do 20% nasyceného alifatického jednomocného alkoholu s 1 až 4 atomy uhlíku.
3. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že se jako alifatický jednomocný alkohol používá etylalkohol.
4. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se řečená tvorba fibril provádí za přítomnosti anorganické soli.
5. Způsob podle bodu 4, vyznačující se tím, že se jako řečená sůl používá síran amonný.
6. Způsob podle bodu 5, vyznačující se tím, že se používá síran amonný v koncentraci od 0,01 do 0,05 M.
7. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se krystalizace provádí za koncentrace glukagonu od 2 do 10 mg glukagonu na ml roztoku.
8. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se provádějí 2 krystalizace po sobě.
9. Způsob podle bodu 8, vyznačující se tím, že se první krystalizace provádí za hodnoty pH v rozmezí od 4,5 do 5,5 a druhá krystalizace za hodnoty pH v rozmezí od 7,0 do 8,5.
10. Způsob izolování glukagonu podle bodu 1, vyznačující se tím, že se z kapaliny nad sedlinou při postupu výroby inzulínu krystalizací v alkalickém prostředí izolují proteiny s obsahem glukagonu isoelektrickým srážením za hodnoty pH 5,2 s následujícím frakcionováním hyperglykemického faktoru při pH 7,5, načež se odděluje glukagon od ostatních proteinů tvorbou glukagonových fibril ve fenolové vodě, okyselené chlorovodíkovou kyselinou za přítomnosti kyseliny etyléndiamintetraoctové a síranu amonného a čistí se takto získaný glukagon krystalizací za hodnoty pH 5,0.

1 výkres

