



POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ **OPIS PATENTOWY**

Nr 46302

Kl. 30 h, 2/10
Kl. internat. A 61 k

VEB Arzneimittelwerk Dresden*)

Drezno, Niemiecka Republika Demokratyczna

Sposób oczyszczania surowych koncentratów Choriongonadotropiny

Patent trwa od dnia 16 maja 1961 r.

Pierwszeństwo: 18 października 1960 r. (Niemiecka Republika Demokratyczna).

Wynalazek dotyczy sposobu oczyszczania Choriongonadotropiny (HCG) występującej w moczu ciężarnych w pierwszych miesiącach ciąży.

Wiadomo, że HCG otrzymuje się z moczu z pierwszych miesięcy ciąży przez zastosowanie różnych adsorbentów. Poza tym znane są sposoby, w których surowy hormon wytrąca się kwasem benzoesowym. Oprócz licznych sposobów oczyszczania posługujących się znanymi w chemii peptydów metodami znany jest poza tym sposób bezpośredniej adsorpcji HCG przez filtrację moczu na permutycie. Do oczyszczania surowych koncentratów znane są dotychczas wyłącznie metody frakcjonowania za pomocą rozpuszczalników organicznych o róż-

nym stężeniu. Wszystkie te sposoby są jednak bardzo kłopotliwe. Nie jest zwłaszcza możliwe otrzymywanie czystego HCG w niewielu zabiegach roboczych, ponieważ w moczu obecne są duże ilości substancji balastowych i pigmentów, które uporczywie towarzyszą HCG we wszystkich stopniach oczyszczania.

Otrzymanie czystego HCG za tym związane jest z licznymi i pracochłonnymi manipulacjami przez co powstają straty w wydajności.

W celu otrzymania różnych czystych gruczołowych proteohormonów takich jak ACTH i ICSH, a także kalikreiny znane są sposoby, według których hormony wytrąca się przez traktowanie związkami akrydyny zasadowo podstawionymi w pozycji 9, w postaci trudno rozpuszczalnych lub nierozpuszczalnych związków adsorpcyjnych i w ten sposób zostają wyosobnione.

*) Właściciel patentu oświadczył, że współtwórcami wynalazku są inż. Reinhold Weidemann i inż. Paul — Gerhard Schulze.

Celem wynalazku było opracowanie sposobu uwolnienia koncentratów HCG od pigmentów i innych substancji balastowych w stosunkowo niewielu zabiegach roboczych.

Stwierdzono, że możliwe jest selektywne usunięcie uporczywie towarzyszących HCG substancji balastowych z moczu, zwłaszcza bardzo przeszkadzających pigmentów moczu przez zastosowanie związków akrydyny, zwłaszcza mleczanu 2-etoksy — 6,9 - dwuaminoakrydyny. Należy przy tym podkreślić, że HCG nie daje nierozpuszczalnego związku adsorbcyjnego i pozostaje w roztworze w czasie frakcjonowania. Poza tym stwierdzono, że za pomocą tego sposobu możliwe jest również usunięcie toksyn pochodzących z moczu i towarzyszących HCG, które prowadzą do silnej pirogenności końcowego produktu.

W połączeniu z frakcjonowaniem za pomocą acetonu możliwe jest uzyskanie w niewielu zabiegach z surowych produktów zawierających HCG, HCG odpowiedniego do stosowania terapeutycznego.

Przykład I. 10 g surowego hormonu z moczu ciężarnych, otrzymanego metodą Katzmiana i Doisy za pomocą kwasu benzoowego o stopniu czystości 100 j.m/mg ekstrahuje się dwukrotnie, po 100 ml, roztworem buforowym składającym się z 30 ml 0,1 mol kwasu octowego i 70 ml 0,1 mol octanu sodowego o wartości $\text{pH} = 4,8$, każdorazowo mieszając godzinę w kąpieli z lodu. Brunatne ekstrakty zmetniacie na skutek opalescencji łączy się i odwirowuje. Następnie dodaje się ciągle mieszając cienkim strumieniem lodowato - zimny aceton aż do stężenia 45%. Mieszaninę przechowuje się w ciągu 1 godziny w chłodni, a następnie uwalnia od kłaczkowatego osadu przez odwirowanie.

Z całkowicie już klarownego roztworu wytrąca się substancję czynną przez podwyższenie stężenia acetonu do 70%. Całość wstawi się do chłodni na 15 minut po czym odwirowuje osad, przemywa dwukrotnie lodowato-zimnym acetonem, a substancję czynną suszy w próżni. (Wydajność około 2,9 g).

Substancję rozpuszcza się w 5-cio krotnej ilości wody redestylowanej, nastawia wartość pH na około 6,8 i wkrapla powoli 1%-owy wodny roztwór mleczanu 2-etoksy — 6,9-dwuaminoakrydyny aż do momentu, w którym już nie powstaje osad. Po jednogodzinnym staniu w chłodni osad osiada po czym odwirowuje się

go i odrzuca. Pozostały roztwór zadaje się lodowato-zimnym acetonem do stężenia 45%. Wytrąca się niewielka ilość osadu, który ponownie odwirowuje się i odrzuca. Przez podwyższenie stężenia acetonu w pozostałym roztworze do 65% wytrąca się hormon. Mieszaninę wstawi się na noc do chłodni po czym osad hormonu odwirowuje się, a następnie uwalnia od resztek akrydyny przez kilkakrotne przemywanie lodowato-zimnym acetonem w szklanej wirówce, w końcu suszy w próżni. Substancję suchą rozpuszcza się w 20 ml lodowatej wody redestylowanej, sączy przez szklany lejek Schott'a G—5, aż do uwolnienia od bakterii i po 24-godzinnym zamrażaniu do temperatury — 30°C suszy w wysokiej próżni. Wydajność 0,69 g o 1250 j.m/mg, co odpowiada w sumie 862000 j.m. (86,2%).

Przykład II. 4g choriongonadotropiny wstępnie oczyszczonej przez frakcjonowanie etanolem zawierającej 600 j.m/mg (razem 2,4 miliona jednostek) rozpuszcza się w lodowato-zimnej wodzie redestylowanej. Po doprowadzeniu wartości pH do 6,8 — 7,2 dodaje się kroplami 3%-owy roztwór mleczanu 2-etoksy — 6,9 dwuaminoakrydyny aż do momentu, w którym nie powstaje już osad. Po krótkim staniu w chłodni osad odwirowuje się i odrzuca.

Do żółto zabarwionego roztworu od mleczanu dodaje się chłodząc lodem i mieszając mechanicznie, bardzo powoli aceton do stężenia 45%. Powstaje niewielka ilość osadu, który po 1-godzinnym staniu w chłodni odwirowuje się i odrzuca. Oddzielenie oczyszczonego hormonu przeprowadza się tak, jak w przykładzie I. Wydajność wynosi 1,8g oczyszczonego hormonu o 1000 j.m/mg, co stanowi 1,8 miliona j.m. (75%).

Przykład III. 100 g surowego hormonu z moczu ciężarnych, otrzymanego metodą Katzmiana i Doisy za pomocą kwasu benzoowego, o stopniu czystości 100 j.m/mg ekstrahuje się dwukrotnie po 100 ml roztworem buforowym z przykładu I, o wartości $\text{pH} = 4,8$, każdorazowo mieszając godzinę w kąpieli z lodu. Brunatne ekstrakty zmetniacie na skutek opalescencji łączy się i odwirowuje. Następnie dodaje się ciągle mieszając cienkim strumieniem lodowato - zimny aceton aż do stężenia 45%. Mieszaninę przechowuje się w ciągu 1 godziny w chłodni, a następnie uwalnia od kłaczkowatego osadu przez odwirowanie.

Z całkowicie już klarownego roztworu wytrąca się substancję czynną przez podwyższenie stężenia acetonu do 70%. Całość wstawia się do chłodni na 15 minut, po czym odwirowuje, osad przemywa dwukrotnie lodowatym zimnym acetonem, a substancję czynną suszy w próżni. (Wydajność około 2,9 g).

Substancję rozpuszcza się w 5-cio krotniej ilości wody redestylowanej, nastawia wartość pH na około 6,8 i wkrapla powoli 1%-owy wodny roztwór mleczanu 2-etoksy — 6,9 - dwuaminoakrydyny aż do momentu, w którym nie powstaje już osad. Po jednogodzinnym staniu w chłodni osad osiada, po czym odwirowuje się go i odrzuca. Pozostały roztwór zadaje się lodowato - zimnym acetonem do stężenia 45%. Wytrąca się niewielka ilość osadu, który ponownie odwirowuje się i odrzuca. Przez podwyższenie stężenia acetonu w pozostałym roztworze do 65% wytrąca się hormon. Mieszaninę wstawia się nieco do chłodni, po czym osad hormonu odwirowuje się, a następnie uwalnia od resztek akrydyny przez kilkakrotne przemywanie lodowo - zimnym acetonem w szklanej wirówce, a w końcu suszy w próżni. Substancję

suchą rozpuszcza się w niewielkiej ilości lodowato - zimnej wody redestylowanej, sączy przez szklany lejek Schott'a G—5 aż do uwolnienia od bakterii i po 24-godzinnym zamrażaniu do temperatury — 30°C suszy w wysokiej próżni. Wydajność wynosi 4,5 g czystego hormonu o 2000 j.m./mg, co odpowiada 9,0 milionom j.m. Wydajność wynosi 90,0%.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób oczyszczania surowej choriongonadotropiny z moczu ciężarnych, znamienny tym, że wodne ekstrakty z surowych koncentratów HCG uwalnia się od substancji balastowych i toksyn przez traktowania ich roztworami związków akrydyny podstawionej w pozycji 9, korzystnie mleczanem 2-etoksy — dwuaminoakrydyny, przy czym substancje te wytrąca się jako nierozpuszczalne w wodzie związki adsorpcyjne i oddziela przez odwirowanie.

VEB Arzneimittelwerk Dresden

Zastępca: Józef Kamiński
rzecznik patentowy