



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

214870

(11) (B2)

(22) Přihlášeno 17 12 75
(21) (PV 8639-75)

(32) (31) (33) Právo přednosti od 20 12 74
(P 24 60 334.7)
Německá spolková republika

(40) Zveřejněno 15 09 81

(45) Vydáno 15 10 84

(51) Int. Cl.³
A 61 K 37/26
C 12 N 9/94

(72)

Autor vynálezu

HÄFNER LEONARD dr., KÖNIGSTEIN/TS., SCHRAMM WILHELM dr.,
KELKHEIM/TS., KARGL HANS, SCHWALBACH/TS., KIESER FRIEDRICH,
EPPSTEIN/TS. (NSR)

(73)

Majitel patentu

HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, FRANKFURT/M. (NSR)

(54) **Způsob současného získání insulinu vedle pankreatinu z čerstvých nebo z hluboce zmrazených vepřových pankreat**

1

Vynález se týká způsobu současného získání insulinu vedle pankreatinu z čerstvých nebo z hluboce zmrazených vepřových pankreat. Pankreata jatečných zvířat jsou jakožto farmaceutická surovina dvojnásobně zajímavá. Jednak se jich používá jakožto jediného výchozího materiálu pro získání insulinu, jednak obsahují pro terapeutické použití hodnotné enzymy. Tak jsou hovězí pankreata důležitá pro získání trypsinu a chymotrypsinu vedle insulinu, zatímco z vepřových pankreat se může získat terapeuticky hodnotná enzymová směs pankreatin s lyolytickým, amylolytickým a proteolytickým působením.

Na základě této bifunkčnosti nechyběly od dob, kdy se začalo pankreatických obsahových látek používat v medicíně, farmácii a technice, pokusy získat oba systémy účinných látek z téhož výchozího materiálu. Takové dvojí zpracování však naráží na potíže, které jsou založeny na tom, že je pro získání insulinu zapotřebí extrakčních podmínek, za kterých se enzymy z největší části ireversibilně inaktivují. Tak pro dokonalou extrakci insulinu jsou výhodné kyselé podmínky, většinou pod hodnotou pH 4, v přítomnosti organického rozpouštědla, většinou 50 až 80 objemových % ethanolu. Amylasy a lipasy pankreasu jsou však za

2

těchto podmínek nestálé a ve velké míře se denaturují.

Větší stálost vykazuje proteolytický systém trypsin-chymotrypsin. Přídavné získání krystalického trypsinu, popřípadě směsí trypsinu a chymotrypsinu s extrakčních zbytků výroby insulinu, je známo například z britského patentového spisu číslo 613 030, z patentového spisu NSR 875 640, z francouzského patentového spisu 999 346, z amerického patentového spisu 2 686 148 a 2 751 330 a z patentového spisu NSR číslo 1 013 834.

Současné získání insulinu a pankreatinu se naproti tomu jeví více problematickým. Ekonomicky použitelný způsob se pro uvedené obtíže dosud neprosadil. Tak je v německém patentovém spise č. 745 284 popsán způsob provádění extrakce insulinu při alkalické hodnotě pH za co možná největší ochrany enzymu. Z německých patentových spisů 874 062 a 875 856 je známa fermenty chránící kyselá extrakce insulinu. Enzymy jsou však i při těchto postupech tak dalece poškozeny, že nelze získat žádný, současným nárokům vyhovující produkt za ekonomických podmínek.

Vedle absolutních oborů pH, při kterých se pracuje, je zřejmě hlavní příčinou pro značnou inaktivaci fermentu použití anorga-

nických, popřípadě organických kyselin pro nastavení hodnoty pH. S tímto poznatkem počítá také způsob podle německé vyložené přihlášky DAS č. 2 146 275. Je v ní popsáno získání insulínu vedle pankreatinu z pankreatu sušeného vymrazováním. Z odtučněných, lyofilizovaných žláz se extrahuje vodně alkoholickým rozpouštědlem, s výhodou 60 až 80 % ethanolem, po přísadě neutrálních solí, jako je chlorid sodný, bez přímé přísady kyseliny insulínu. Extrakce insulínu z čerstvých nebo z hluboce zchlazených pankreat po přísadě solí, jako je chlorid sodný nebo chlorid amonný, je známa z amerického patentového spisu č. 2 779 706.

Všechny dosud popsané způsoby mají závažné nedostatky, založené jednak na tom, že jsou výtěžky insulínu nepatrné, jednak na tom, že se enzymy v široké míře inaktivují, nebo že zahrnují technologicky nákladné a tím drahé výrobní fáze, jako je sušení vymrazováním.

Předmětem vynálezu je způsob současného získání insulínu vedle pankreatinu z čerstvých nebo z hluboce zmrazených vepřových pankreat extrakcí žláz v přítomnosti acetonu, který je vyznačen tím, že se k extrakci používá reakční směs alespoň se 40 procenty acetonu a extrahuje se při hodnotě pH 5 až 7, přičemž se pro nastavení hodnoty pH používá ve vodě rozpustných solí s kationty, které vytvářejí s kyselými doprovodnými látkami insulínu za extrakčních podmínek nedisociované sloučeniny, po extrakci se popřípadě po další přísadě acetonu oddělí pevná látka od extraktu, extrakt se o sobě známým způsobem dále zpracovává na insulín a pevná látka se po oddělení z extrakční směsi neprodleně pufrem nastaví na hodnotu pH nad 5,6 a o sobě známým způsobem se zpracovává na pankreatin.

Při tomto způsobu se odstraní nedostatky dosud známých způsobů. S překvapením se zjistilo, že je možná extrakce insulínu z čerstvých nebo s hlubokým chlazením konservovaných pankreat velmi šetrným způsobem, jestliže se do rozmělněných žláz, suspendovaných ve směsi vody a acetonu, přidá roztok solí, jejíž kationty jsou schopné reagovat s obsahovými látkami žláz takovým způsobem, že se z reakční směsi uvolňují vodíkové ionty, které posunují hodnotu pH. Především přicházejí pro uvolňování vodíkových iontů v úvahu mastné kyseliny, které vytvářejí s kovovými ionty nedisociované sloučeniny. Jakožto kovové ionty přicházejí v úvahu takové ionty, které jsou fyziologicky nezávadné, protože většinou nelze vyloučit, aby zbytky těchto solí nezůstávaly v pankreatinu.

Naproti tomu přicházejí méně v úvahu takové kovové ionty, obzvláště takové ionty těžkých kovů, které mají nepříznivý vliv na konečné produkty se zřetelem na hormonální, popřípadě fermentovou aktivitu. S výhodou se používá ve vodě rozpustných vápena-

tých solí, může se však také použít solí hořečnatých, zinečnatých, hlinitých, železitých, solí kobaltu, niklu, cínu a manganu. Potřebné množství přidávaných solí se stanoví měřením hodnoty pH. Vápenatých solí, zvláště chloridu vápenatého, se používá s výhodou, jednak pro jejich dobrou rozpustnost, jednak pro jejich fyziologickou nezávadnost. Výhodným vedlejším působením vápenatých iontů je jejich známá vlastnost stabilizovat enzymy.

Například lze přísadou asi 0,7 % chloridu vápenatého do rozmělněných žláz, suspendovaných ve směsi acetonu a vody, dosáhnout posunutí hodnoty pH směsi na hodnotu 5 až 6, s výhodou 5,4 až 5,6; to jsou podmínky, za kterých citlivé enzymy pankreasu utrpí sotva znatelné poškození. Tento efekt lze zesílit popřípadě přísadou vhodné soli, jestliže chemická reakce této soli se solí vápenatou ovlivňuje uvolňování vodíkového iontu. Pro tento účel jsou vhodné kyselé soli vícesytných kyselin, jestliže odpovídající vápenaté soli, které se přitom vytvoří, za dosavadních podmínek slabě disociují nebo vůbec nedisociují. Například se pro tento účel hodí natriumdihydrogenfosfát nebo dinatriumhydrogenfosfát.

Přísady jiných neutrálních solí, jako chloridu sodného nebo chloridu amonného a jiných solí, kterých se popřípadě používá pro extrakci insulínu za jiných podmínek, neruší tyto reakce a mohou se rovněž přidávat.

Způsob podle vynálezu se může například provádět takto: Čerstvá nebo hlubokým chlazením konservovaná vepřová pankreata se rozmělní a suspendují se ve směsi například z 24 objemových % a 76 objemových % acetonu, do které se popřípadě přidaly uvedené neutrální soli, jakož také již uvedené soli vícesytných kyselin. Pro extrakci a následné oddělení nerozpuštěných podílů žláz je výhodné udržovat koncentraci acetonu v kapalné fázi na 40 až 80 objemových %, aby se na jedné straně umožnilo rozpouštění insulínu ze tkáně žláz a na druhé straně aby se zabránilo aktivaci zymogenu autolytickými pochody v nasadové směsi.

Objem extrakční kapaliny je dán praktickou úvahou, která je založena na dostatečném rozpouštění účinné látky a na příznivé technické manipulaci se suspenzí. Obzvláště výhodné je provedení způsobu, při kterém je obsah pevné látky v suspenzi asi 10 až 20 %. Do této směsi se pak s výhodou teprve nyní přidává vápenatá sůl, nejlépe ve formě vodného roztoku. Suspenze, upravená na požadovanou hodnotu pH, s výhodou na hodnotu mezi 5 a 7, nejvýhodněji však na hodnotu 5,4 až 5,6 se míchá. Pokud se pracuje v běžných míchacích nádobách, je dostatečnou extrakční dobou 0,5 až 1,5 hodin. Pak se pevné látky oddělí, s výhodou odstředěním. Pevná látka se může způsobem podle vynálezu několikrát extrahovat, počet extrakcí se však má v zájmu dobré kvality

pankreatinu udržovat podle možnosti nízký.

Vyčištěné extrakty se popřípadě spojí a přísadou alkalických roztoků se hodnota pH upraví na 7 až 8, s výhodou na 7,3 až 7,7. K tomuto účelu se s výhodou používá slabé amoniakální vody, sodného louhu nebo vodného roztoku soli hydrolyzující s alkalickou reakcí, jako je například dinatriumhydrogenfosfát. Přitom popřípadě vyvločkovaná inertní proteinová frakce se může oddělit odstředěním. Reakce čirého extraktu se opět nastaví na kyselou, ve vakuu se odstraní aceton, koncentrát se vysráží chloridem sodným a získaný solný koláč se o sobě známým způsobem dále zpracuje na insulin.

Po oddělení extraktu obsahujícího insulin představuje zbylá pevná látka výchozí materiál pro pankreatin. Ke chránění aktivity fermentu se neprodleně přísadou roztoku pufrové soli nebo směsi pufrových solí upraví hodnota pH na 6 až 7 a pak se o sobě známým způsobem dále zpracovává na pankreatin: dvakrát opakovanou extrakcí vysoko-percentním acetonem se zbaví tuku, odvední se a pak se usuší. Způsob tohoto dalšího zpracování je popsán v následujícím příkladu 1.

Příklad 1

50 kg hluboce zmrazeného vepřového pankreasu se rozměle na masovém strojku a suspenduje se při teplotě 15 °C v předložené směsi ze 130 l acetonu a 50 l vody. Přidáním vodného roztoku chloridu vápenatého (100 g chloridu vápenatého v 150 ml vody) se hodnota pH nastaví na 5,6. Míchá se po dobu 30 minut při teplotě 15 °C, smíchá se se 45 l acetonu a pevná látka se oddělí odstředěním. Čirá fáze obsahuje insulin a pevná hmota se zpracuje na pankreatin.

Pevná látka se natěsťuje 40 l vodného roztoku dinatriumhydrogenfosfátu, který obsa-

huje tolik fosfátu, aby se nastavila hodnota pH na 6,0 až 6,5, a vakuovou destilací při teplotě produktu 25 °C se uvede na obsah acetonu 15°. Hustý tekutý destilační zbytek se nyní podle kvality žláz udržuje až po dobu tří hodin na teplotě 25 °C, pak se rozmíchá s 250 l acetonu a zahřeje se na teplotu 30 °C.

Pevná látka a čirá fáze se oddělí odstředěním. Pevná látka se znovu extrahuje při teplotě 25 °C 150 l acetonu, který obsahuje 10 l vody, oddělí se odstředěním a k udržení aktivity fermentu se suší ve vakuu při teplotě 25 až 30 °C.

Výtěžek je 9 kg pankreatinu s touto fermentační aktivitou:

90 amylasových jednotek podle Willstättera,

75 lipasových jednotek podle Willstättera,

160 proteasových jednotek podle Willstättera.

Insulinový extrakt, získaný odstředěním, se odpařuje ve vakuu až do odstranění acetonu. Přitom vypadlý tuk se oddělí. Z vodného destilačního zbytku se rozpuštěný insulin izoluje vysrážením kuchyňskou solí a následnou krystalizací.

Výtěžek je 3 g insulinu s 25 I. J./mg, to je 75 000 I. J. insulinu.

Příklad 2

Směs předložená k extrakci insulinu se skládá ze 120 l acetonu a 50 l vody, ve které je rozpuštěn 1 kg chloridu amonného a 0,5 kilogramů prim. natriumhydrogenfosfátu.

Jinak jsou složení náklady, pracovní podmínky a výtěžky stejné jako při způsobu popsaném v příkladu 1.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob současného získání insulinu ve dle pankreatinu z čerstvých nebo z hluboce zmrazených vepřových pankreat extrakcí žláz v přítomnosti acetonu, vyznačený tím, že se k extrakci používá reakční směs alespoň se 40 % acetonu a extrahuje se při hodnotě pH 5 až 7, přičemž se pro nastavení hodnoty pH používá ve vodě rozpustných solí s kationty, které vytvářejí s kyselými doprovodnými látkami insulinu za extrakčních podmínek nedisociované sloučeniny, po extrakci se popřípadě po další přísadě acetonu oddělí pevná látka od extraktu, extrakt se o sobě známým způsobem dále zpracovává na insulin a pevná látka se po oddělení

z extrakční směsi neprodleně puforem nastaví na hodnotu pH nad 5,6 a o sobě známým způsobem se dále zpracovává na pankreatin.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se do extrakční směsi přidávají rozpustné kyselé soli vícesytných kyselin a k nastavení hodnoty pH se používá ve vodě rozpustných solí, jejichž kationty vytvářejí s anionty přidávaných kyselých solí za extrakčních podmínek nedisociované soli.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se extrakce insulinu provádí při obsahu acetonu 50 až 60 % v extrakční směsi a oddělování pevné látky z extraktu při obsahu acetonu 60 až 70 %.