



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 27.02.75 (P. 178370)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 09.10.76

Opis patentowy opublikowano: 14.10.1978

MKP A61k 17/04

Int. Cl.² A61K 37/26

CZYTELNIA

Urzędu Patentowego
Państwa Rzeczypospolitej Ludowej

Twórca wynalazku: _____

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

Sposób oczyszczania insuliny w postaci soli metalu alkalicznego lub soli amonowej

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób oczyszczania insuliny w postaci soli metalu alkalicznego lub soli amonowej na drodze filtracji przez żel przy pH o wartości 2,0—3,5.

Od czasu odkrycia insuliny w roku 1921 jako składnika trzustki, osiągnęła ona ogromne znaczenie na świecie w leczeniu cukrzycy. Ponieważ w celu wyizolowania insuliny z tkanek trzustki stosuje się metody ekstrakcyjne, równocześnie z insuliną usuwane są znaczne ilości protein, nie będących insuliną.

Zostały podjęte znaczne wysiłki w kierunku rozwinięcia metod oczyszczania insuliny, tj. metod oddzielenia insuliny od protein, nie będących insuliną. Liczne z tych metod uzyskały ważne znaczenie handlowe.

Jedna z tych ważnych z handlowego punktu widzenia metod wywodziła się z ogólnego stwierdzenia, że proteina posiada minimum rozpuszczalności w punkcie izoelektrycznym, inne współczynniki pozostawały bez zmian. Banting i inni w opisie patentowym St. Zjedn. Amer. nr 1 469 994 podali sposób oczyszczania, polegający na wytrącaniu zawartych w wodnym wyciągu z trzustki protein, nie będących insuliną, w ich punkcie izoelektrycznym. Izoelektryczne wytrącanie insuliny przy pH = 4—7 z wodnego ekstraktu trzustki zostało opisane przez Waldena w opisie patentowym St. Zjedn. Amer. nr 1 520 673.

W innej metodzie wcześniejszej wytrącanie insuliny było przeprowadzane przez dodanie odpowiedniej ilości nieorganicznej soli. Murlin w opisie pa-

2

tentowym St. Zjedn. Amer. nr 1 547 515 pierwszy opisał proces wysalania insuliny z rozpuszczalnika ekstrahującego za pomocą chlorku sodowego. Inny proces wysalania został opisany przez Lautenschlagera i innych w opisie patentowym St. Zjedn. Amer. nr 2 449 076, polegający na wysalaniu insuliny z obojętnego ekstraktu przez dodanie chlorku sodowego, przesączeniu, ponownym rozpuszczeniu pozostałości i ponownym wysoleniu insuliny, lecz solą o niższym stężeniu niż zastosowana w pierwszym etapie wysalania.

Trzecia metoda handlowo ważna oczyszczania insuliny polega na wytrącaniu lub krystalizacji insuliny z roztworu w postaci kompleksu z cynkiem. Na ogół, cynk insulinę wytrąca się z buforowanego wodnego roztworu, zawierającego jony cynku. Różne bufony są stosowane. Petersen np. wg opisu St. Zjedn. Amer. nr 2 626 228 stosuje kwas cytrynowy — cytrynian. Niniejszy przemysłowy sposób oczyszczania insuliny jest rozwinięciem wszystkich trzech powyższych metod. Ponieważ cynk insulina jest najważniejszą handlową postacią insuliny, ostatni etap oczyszczania insuliny jest zazwyczaj etapem krystalizacji cynku.

Jednakże proteiny nieinsulinowe, wśród których przeważają proinsulina i proteiny proinsulinopodobne zostały uznane w ostatnich latach jako składniki niepożądane handlowej cynk insuliny. Jakkolwiek składniki te na ogół stanowią mniej niż około 8% wagowych handlowej cynk insuliny, niektóre z nich

zostały uznane za antygeny lub czynniki immunogeniczne. Patrz np. Chance i inni *Science* 161, 165 (1968); Steiner i inni, *Diabetes*, 18, 725 (1968); Bromer, *Bio-Science*, 20, 701 (1970); oraz Rubenstein i inni *Am. Rev. Med.* 22, 1, (1971).

Tak więc stałym problemem jest usuwanie protein nieinsulinowych z insuliny na skalę przemysłową.

Określenie „insulina” stosowane w opisie dotyczy nie tylko insuliny jako takiej, ale również wszystkich protein insulino — podobnych, takich jak dezamido-insulina. Ponieważ insulina i proteiny insulino — podobne posiadają podobną aktywność hypoglicemiczną, zazwyczaj nie ma potrzeby oddzielania insuliny od wszystkich innych protein, zawartych w trzustce tj. normalnie nie jest wymagana insulina homogeniczna. Techniki oczyszczania substancji biologicznych na skalę laboratoryjną, takie jak elektroforeza i chromatografia na jonach, są znane w celu oddzielania składników nieinsulinowych od insuliny, będącej składnikiem preparatów handlowych insuliny (lub nawet surowej). Techniki te pozwalają nawet rozłożyć składnik insuliny w insulinę jako taką i insulinę desamidowaną. Jednakże takie procedury posiadają wątpliwą przydatność na dużą skalę.

Procesem bardziej nadającym się do zastosowania na dużą skalę jest chromatografia na żelu (synonimem jest gel exclusion chromatography i gel permeation chromatography). W metodach tych proteiny są rozdzielane w kolumnie, wypełnionej żelem, który jest sieciowany w taki sposób, że pory są wytwarzane dla każdego żelu oddzielnie. Pory te posiadają określoną, wymierzalną objętość, która jest wprost proporcjonalna do stopnia spekcjonowania żelu i odwrotnie proporcjonalna do stopnia usieciowania. Ponieważ cząsteczki mniejsze mają większy dostęp do tych por niż cząsteczki większe, przesuwanie się mniejszych cząsteczek przez kolumnę jest hamowane w stosunku do większych cząsteczek, które mają tylko częściowy lub żaden dostęp do por.

Filtracja na żelu stosowana była dawniej przy oczyszczaniu insuliny. Przy wyosabnianiu pojedynczej insuliny z trzustki kota otrzymuje się surową insulinę na drodze ekstrakcji kwas/alkohol, którą następnie traktuje się alkaliem w celu usunięcia substancji nieaktywnych, następnie zateża, poddaje izoelektrycznemu wytrącaniu i wreszcie wytrącaniu przez wysolenie chlorkiem sodu. Surową insulinę wprowadza się do kolumny, wypełnionej sieciowanym żelem dekstranowym i eluuje 1,0 n kwasem octowym [Davoren, *Biochim. Biophys. Acta*, 63, 150 (1962)].

Przy wyosabnianiu insuliny z ryb, gruczoły homogenizuje się w wodzie, a proteiny wytrąca roztworem kwasu trójchlorooctowego, ekstrahuje roztworem kwas/etanol, a ekstrakt traktuje chlorkiem metylenu w celu usunięcia lipidów. Pozostałe ciała stałe izoluje się, przenosi do 5,0 m roztworu kwasu octowego, i przesącza przez kolumnę, wypełnioną sieciowanym żelem dekstranowym, następnie eluuje 5,0 m kwasem octowym. [Humbel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 12, 333 (1963)]. Podawano wydajność około 80%. Należy zauważyć, że Humbel stwierdził, że w celu dobrego oddzielenia insuliny od innych protein, warunki elucji powinny ułatwić dysocjację cząsteczek insuliny. Sugeruje on dalej, że 1,0 n kwas

octowy nie jest odpowiednim rozpuszczalnikiem, ponieważ według Yphantis i Wangh [*Biochim. Biophys. Acta*, 26, 218 (1957)] insulina nie jest w tym przypadku całkowicie zdysocjowana.

5 Surowy ekstrakt trzustki wołowej został przesączony przez sieciowany żel dekstranowy przez Epstein i innych, *Biochemistry*, 2, 461, (1963). Rozpuszczalnikiem eluującym był 0,2 m węglan amonu, rozpuszczalnikiem polecanym również przez Hum-
10 belę był supra. Epstein i inni podawali wydajność około 60%.

Insulina była nawet izolowana z trzustki ludzkiej. Gruczoły były najpierw homogenizowane i ekstrahowane. Frakcjonowanie siarczanem amonu usuwa-
15 ło niektóre substancje nieaktywne. Następnie wytrącano insulinę, najpierw chlorkiem sodu, następnie stosując wytrącanie izoelektryczne. Otrzymaną insulinę rozpuszczano w 0,5 n kwasie octowym i przesącza-
20 ną insulinę przeprowadzano w cynk insulinę [Jackson i inni, *Diabetes*, 18, 206 (1969)]. Wydajność insuliny po przesączeniu przez żel wynosiła około 60%.

Wreszcie, sączenie przez żel i chromatografia jonitowa zostały połączone przez Schlichthsulla i in-
25 nych, jak podano w opisie patentowym Południowej Afryki nr 69/5280 (odpowiada opisowi patentowemu belgijskiemu nr 737 257).

W jedynym przykładzie dotyczącym sączenia przez żel (przykład I) cynk insulina była przepuszczana
30 przez kolumnę z sieciowanym żelem dekstranowym z wydajnością 80%. Rozpuszczalnikiem eluującym był 1,0 n kwas octowy. Należy podkreślić, że Schlichthsull i inni uznali za konieczne, po filtracji, wysalanie, wytrącanie izoelektryczne i krystalizację cynku w celu otrzymania cynk insuliny.

Każdy z uprzednich sposobów stosowania sączenia przez żel w celu oczyszczenia insuliny powodował na ogół straty insuliny. Ponadto poprzednie metody nie dawały pewności, że w wyniku stosowania
40 sączenia przez żel otrzymuje się tylko insulinę (włącznie z proteinami insulinopodobnymi jak podano powyżej).

Na ogół, w procesie według wynalazku można zastosować każdy odpowiedni pęczniący w wodzie żel do rozpuszczonych protein. Jednakże takie żele będą
45 posiadały w stanie suchym lub nie spekcjonowanym co najmniej około 4% wagowych wody, w przeliczeniu na suchy żel i średnice cząsteczek będą mniejsze niż około 100 mikronów.

Korzystnie, gdy zawartość wody w żelach będzie w granicach około 4—98%, a zwłaszcza 5—20%. Ko-
50 rzystne, gdy średnice suchych cząsteczek żelu są mniejsze niż około 80 mikronów; szczególnie korzystny jest zakres średnic cząsteczek od około 20 do około 80 mikronów.

Przykładami odpowiednich żeli między innymi są skrobia (włącznie z kukurydzianą), sieciowany galaktomannan, sieciowany dekstran-agar lub agarozę, poliacyloamidy, kopolimery acyloamidu z metyleno-bis-
60 akryloamidem, kopolimery metyleno-bis-akryloamidu z winylo-etylo-karbitolem i z winylo-pirolidonem i podobnymi. Najodpowiedniejszymi żelami są sieciowane dekstrany, takie jak sephadex, produkowane i sprzedawane przez Pharmacia Fine Chemicals,
65 Inc. Piscataway, N.J., USA.

Rodzaj stosowanych kolumn nie jest istotny. Wybór wysokości, średnicy i kształtu zależy od pożądanych parametrów procesu. Oczywiście ze wzrostem wysokości kolumny maleje szybkość przepływu; stwierdzono niezależnie od siebie, że opór kolumny jest wprost proporcjonalny do jej wysokości. Z tego powodu korzystny jest kształt kominowy kolumny, taki jak Pharmacia Sectional Column KS — 370. Dla celów normalnej produkcji służy bardzo dobrze kolumna, złożona z 6 części.

W przybliżeniu zadowalające oczyszczenie insuliny można przeprowadzić w kolumnie, wypełnionej około 4,5 g insuliny w postaci soli metalu alkalicznego lub soli amonowej na litr objętości podłoża. Takie wypełnienie jest najkorzystniejsze. Jednakże, na ogół wypełnienie kolumny może wynosić 0,8—6,7 g na litr objętości podłoża, korzystnie 3,5—5,0 g na litr objętości podłoża. Naturalnie optymalne warunki mogą być ustalone z łatwością dla każdej kolumny.

Żel można spęczniać i wypełniać kolumnę spęcznionym żelem w dowolny znany sposób. Na ogół żel spęcznia się w środku eluującym albo można go spęcznić w 30%-owym roztworze wodnym etanolu, zdekantować i środowisko spęczniające zastąpić środowiskiem eluującym.

Wynalazek dotyczy sposobu oczyszczania insuliny w postaci soli metalu alkalicznego lub soli amonowej, polegającego na spęcznianiu żelu, zawierającego w stanie suchym co najmniej około 4% wagowych wody, średnice cząsteczek mniejsze niż około 100 mikronów, napełnieniu kolumny spęcznionym żelem, podaniu na kolumnę wodnego roztworu insuliny w postaci soli metalu alkalicznego lub soli amonowej o czystości co najmniej około 80%, przy czym stężenie insuliny leży w granicach 1—8% wagowych na objętość; całkowita ilość insuliny jest wystarczająca do wypełnienia kolumny w granicach od około 0,8 około 6,7 g na litr objętości podłoża, przy pH roztworu w granicach 2,0—3,5 i elucji insuliny z kolumny w temperaturze 5—30°C wodnym roztworem eluanta o pH, utrzymanym w takich samych granicach jak roztwór insuliny.

Rysunek przedstawia diagram elucji dla przykładu I. Diagram przedstawia graficznie gęstość optyczną przy 280 mμ pewnych frakcji roztworu insuliny podczas procesu chromatografii na żelu.

Insulinę w postaci roztworu soli metalu alkalicznego lub soli amonowej można wytwarzać w dowolny znany sposób. Np. można rozpuścić insulinę w odpowiedniej ilości środka eluującego lub można rozpuścić insulinę w wodnym środowisku, które jest nieco bardziej kwaśne (jednakże w granicach pH środka eluującego) niż środek eluujący. Np. jeśli środkiem eluującym jest 0,5 n kwas octowy o pH = 2,5, insulinę można rozpuścić w wodnym środowisku o pH około 2,3 to jest w 1,0 n kwasie octowym.

Insulina w postaci soli metalu alkalicznego lub amonowej ma z natury rzeczy charakter zasadowy. W konsekwencji po rozpuszczeniu insuliny w obojętnym lub kwaśnym środowisku wodnym, pH otrzymanego roztworu wzrasta. Tak więc, jeśli insulinę rozpuści się w 1,0 n kwasie octowym, pH otrzymanego wzrasta do około 2,7. Jednakże, w zależności od

stężenia zastosowanej insuliny, roztwór insuliny może dochodzić do pH = 3,2.

Wzrost pH jest zjawiskiem normalnym i nie stwarza problemów pod warunkiem, że pH roztworu insuliny nie przekroczy około 3,5. Insulinę można również rozpuścić w 0,5 n kwasie octowym i pH skorygować na wartość poniżej około 3,2 za pomocą rozcieńczonego kwasu solnego.

Na ogół, insulinę w postaci soli metalu alkalicznego lub soli amonowej można wytwarzać w dowolny znany sposób. Jednakże korzystnie jest wytwarzać sposobem, opisanym w opisie patentowym St. Zjedn. Amer. nr 3 719 655.

Jak wykazano powyżej insulina powinna być o czystości co najmniej 80%. To jest, zawartość insuliny włącznie z proteinami insulinopodobnymi, wykazującymi aktywność hypoglicemiczną, powinna wynosić co najmniej około 80% całkowitej zawartości protein.

Stężenie roztworu soli metalu alkalicznego lub amonowej insuliny wprowadzonego na kolumnę powinno wynosić, jak stwierdzono powyżej, 1—8% wagowych na objętość. Korzystne stężenie 4—6%.

Zadowalające rezultaty otrzymuje się, gdy sól metalu alkalicznego lub soli amonowej insuliny rozpuści się w mniejszej objętości rozpuszczalnika niż objętość stosowana przy rozdzielaniu, co zostało omówione poniżej.

W chromatografii, współczynnik podziału K_d jest określony jako stosunek stężenia substancji rozpuszczonej w fazie ruchomej do stężenia substancji rozpuszczonej w fazie stacjonarnej. W sączeniu przez żel fazę ruchomą stanowi rozpuszczalnik, poruszający się w przestrzeni por pomiędzy cząsteczkami żelu, a fazę stacjonarną stanowi rozpuszczalnik, pochłonięty w cząsteczkach żelu tj. zatrzymany w porach wewnątrz każdej cząsteczki żelu. Tak więc współczynnik K_d dotyczy tej frakcji pochłoniętego rozpuszczalnika, która jest nasycona substancją rozpuszczoną.

W określeniach K_d , objętość eluanta, V_e , substancji rozpuszczonej może być wyrażona równaniem

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

gdzie: V_0 oznacza objętość por w kolumnie, V_i oznacza objętość pochłoniętego rozpuszczalnika. Oznaczając K_d , równanie przyjmuje postać

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

Jeśli gęstość wody przyjmie się za jedność, $V_i = a \cdot W_r$, gdzie a oznacza ciężar suchego żelu, W_r , zawartość wody. W ten sposób

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{a \cdot W_r}$$

i może być oznaczony doświadczalnie przez fachowców z tej dziedziny.

Przyjmując, że roztwór zawiera dwie substancje rozpuszczone, objętość elucji dla każdej substancji rozpuszczonej wyraża się następująco:

$$V'_0 = V_0 + K'_d V_1$$

$$V''_0 = V_0 + K''_d V_1$$

Objętość rozdzielania, V_s , stanowi różnicę pomiędzy objętością elucji dwóch substancji rozpuszczonych.

$$V_s = V'_0 - V''_0$$

$$V_s = (K'_d - K''_d) V_1$$

Z powyższego wynika, że stopień rozdzielania dwóch (lub więcej) substancji rozpuszczonych jest częściowo zależny od obciążenia kolumny. Kiedy ilość substancji rozpuszczonych o niższym ciężarze cząsteczkowym zbliża się do granicy wolnych por, rozdział dwóch substancji rozpuszczonych z konieczności musi zmaleć.

W granicach obciążenia, określonych jako część niniejszego wynalazku, stopień rozdzielania może się zmieniać. W pewnych przypadkach, wyższe obciążenie kolumny może być dopuszczone do zrównoważenia rozdzielania w stosunku do wydajności.

Jak stwierdzono uprzednio środek eluujący może posiadać pH w granicach 2,0 do 3,5. Na ogół środkiem elującym może być wodny roztwór dowolnego kwasu nieorganicznego lub organicznego, wobec którego białka są trwałe.

Przykładami takich kwasów są: kwas chlorowodorowy, fosforowy, mrówkowy, octowy, propionowy, n-masłowy, izomasłowy, pentanokarboksylowy i podobne. Korzystne jest stosowanie kwasu octowego. Jeśli stosuje się kwas chlorowodorowy, należy dodawać do środka elującego środek ochronny, taki jak fenol. Należy podkreślić, że kwas octowy działa jak środek ochronny. Korzystnie stosuje się pH około 2,5. W konsekwencji, najkorzystniejszy środek elujący stanowi 0,5 n roztwór kwasu octowego.

Jeśli trzeba, środek elujący może zawierać sól nieorganiczną w ilości do około 0,02 m na litr, taką jak chlorek sodu, chlorek potasu, chlorek amonu i podobne. Korzystne stężenie wynosi 0,01 m, a korzystną solą jest chlorek sodu. Zastosowanie takiej soli jest korzystne w celu polepszenia zdolności rozdzielczej i zabezpieczenia substancji podstawowej przed zaabsorbowaniem przez żel.

Elucję kolumny można przeprowadzić w granicach temperatur 5–30°C. Korzystnie w temperaturze otoczenia lub niższej.

Przebieg elucji można kontrolować w jakikolwiek dogodny sposób. Jednakże szczególnie dogodna jest metoda pomiaru absorpcji każdej frakcji przy 280 mμ. Frakcje te stanowiące oczyszczony składnik insuliny, łączy się i zazwyczaj przeprowadza w cynk insulinę.

Jak zaznaczono powyżej, cynk insulina jest najważniejszą postacią insuliny. W konsekwencji, otrzymaną w procesie insulinę w postaci soli metalu alkalicznego lub soli amonowej o wysokiej czystości przeprowadza się w cynk insulinę. Przemianę w cynk insulinę przeprowadza się korzystnie przy pH = 6,0 w obecności octanu amonu jako buforu. Nie ma potrzeby izolowania soli metalu alkalicznego lub amonowej insuliny ze środowiska elującego lub zateżniania roztworu oczyszczonej insuliny przed krysta-

lizacją z cynkiem. Postępem w niniejszym procesie jest, że roztwór izolowanej insuliny jest dostatecznie stężony i nie ma potrzeby stosowania wysalania lub izoelektrycznego wytrącania, jakkolwiek, jeśli trzeba, można te procesy stosować.

W wyniku stosowania sposobu według wynalazku otrzymuje się cynk insulinę o większej czystości. Ta polepszona czystość może być udowodniona różnymi metodami. Cynk insulinę można analizować bezpośrednio na obecność protein nieinsulinowych, takich jak proinsulina i glukagon.

Obecność protein wielkocząsteczkowych, do których należy protaminaza, proteolityczny enzym, może być oznaczona przez pomiar stabilności zawiesiny protaminowej w podwyższonej temperaturze; jeśli protaminaza jest obecna, kompleks insuliny protaminowej będzie dysocjował z powodu rozkładu protaminy. Mogą być mierzone fizyczne własności, takie jak rozpuszczalność cynku insuliny w obojętnym pH i zabarwienie otrzymanego roztworu. Wreszcie, aktywność właściwa insuliny może być mierzona za pomocą prób bakteriologicznych i immunologicznych.

Z powodu wyższej czystości cynk insulina, otrzymana sposobem według wynalazku, jest pożądanym składnikiem przy wytwarzaniu różnych postaci farmakologicznych insuliny, takich jak insulina zwykła, insulina izofanowa, protaminowa cynk insulina, zawieszina cynku insuliny, insulina globinowa i podobne. Następnie, bardziej czysta insulina umożliwia otrzymanie obojętnej insuliny, która jest postacią bardziej trwałą niż insulina w postaci kwasowej.

Zanieczyszczenia, które poprzednio występowały w cynku insulinie, często wytrącają się częściowo w obojętnym pH. Takie zanieczyszczenia zawierałyby często enzymy, powodujące rozkład insuliny, takie jak tripsyna i chymotrypsyna, które zmniejszają aktywność preparatu insuliny. Bardziej czysta insulina umożliwia wytwarzanie preparatów insuliny o przedłużonym działaniu z wieprza i wołów bez dodatkowego oczyszczania, wymaganego uprzednio. Wreszcie, wytwarzanie insuliny izofanowej z bardziej czystej cynku insuliny wymaga mniejszej ilości protaminy, ponieważ brak zanieczyszczeń proteinami kwasowymi umożliwia użycie protaminy tylko w ilości, niezbędnej do wytrącenia insuliny.

Sposób według wynalazku może ewentualnie być połączony z innymi sposobami oczyszczania. Np. roztwór insuliny w postaci soli metalu alkalicznego lub amonowej można poddawać jednemu lub więcej procesom sączenia przed procesem sączenia przez żel. Również insulinę elowaną można poddawać jednemu lub więcej procesom sączenia przed reakcją przemiany w cynk insulinę.

Przykład I. Sיעiowany żel dekstranowy o zawartości wody 5% i wymiarach cząsteczek 20–80 μ potraktowano 0,5 n kwasem octowym. Laboracyjną kolumnę K 100/100 (Pharmacia Fine Chemicals Inc.) o przekroju 10 cm i wysokości 100 cm napełniono spieczonym żelem do objętości podłoża 7 litrów (głębokość podłoża 89 cm). 17,5 g insuliny sodowej (z trzustki wołu), otrzymanej sposobem wg opisu patentowego St. Zjedn. Amer. nr 3 719 655, o aktywności 23,8 jednostek/mg i zawartości proinsuliny 4,21% wagowych rozpuszczono w 400 ml 0,5 n kwasu octowego. Roztwór insuliny wprowadzono do kolum-

ny i eluowano 0,5 n kwasem octowym pod ciśnieniem 5 psig, uzyskując szybkość przepływu 900 ml/godz. (liniowa szybkość przepływu 0,19 ml/cm²/min). Następnie przeprowadzono elucję por o objętości (1725 ml); Frakcje po 23,5 ml zostały połączone. Zawartość protein została oznaczona za pomocą pomiaru absorpcji w ultrafiolecie przy 280 mμ. Oznaczono również zawartość ciał stałych w mg/ml. Zebrano 240 frakcji. Frakcje podzielono na 4 grupy, omówione poniżej w tablicy 1.

Tablica 1

Grupa	Objętość	Frakcje	Substancje stałe ^a	Wyniki identyfikacji
	w ml		w %	
A	1405	10—69	1,4	Wielkocząsteczkowe proteiny i enzymy
B-1	1193	70—119	2,4	Główna proinsulina
B-2	978	120—160	9,7	Proinsulina i insulina pośrednia
C	1520	161—225	86,4	Insulina

^a % wszystkich eluowanych substancji stałych

Do grupy C dodano 3,0 ml 20% roztworu chlorku cynku, a otrzymany roztwór rozcieńczono do objętości 3025 ml 0,5 n wodorotlenkiem amonu, pH końcowego roztworu skorygowano do wartości 6,0 za pomocą rozcieńczonego roztworu wodorotlenku amonu. Wytrąconą cynk insulinę izolowano przez odwirowanie przemywano kolejno wodą, alkoholem absolutnym, eterem i suszono pod próżnią. Wydajność cynk insuliny wynosiła 13,9 g; aktywność insuliny wynosiła 25,6 jednostek/mg i zawartość proinsuliny 0,44%.

Ponieważ zawartość ciał stałych grupy C stanowiła 86,4% całkowitej ilości eluowanych ciał stałych, maximum wydajności ciał stałych grupy C wynosiła 86,4% 17,5 g lub 15,1 g; w przeliczeniu na jednostkę podstawową, maximum wydajności powinno wynosić około 360 000 jednostek. Tak więc wydajność cynk insuliny z grupy C odpowiada 91,9% w przeliczeniu na ciężar produktu wyjściowego i 98,9% w przeliczeniu na jednostkę produktu wyjściowego. W odniesieniu do produktu wyjściowego ciężar wynosi 79,4% a % jednostek 85,4.

Grupę B-2 wytrąca się za pomocą nadmiaru jonów cynku, jak opisano powyżej dla grupy C, rozpuszcza ponownie w 0,5 n kwasie octowym i przesącza na małej kolumnie. Insulinowy pik rekrystalizuje się, jak opisano powyżej dla grupy C, wprowadzając dodatkowo 1,0 g cynk insuliny o aktywności 26,7 jednostek/mg. Tak więc całkowita ilość cynk insuliny, w przeliczeniu na produkt wyjściowy, wynosiła 85,1% w stosunku do ciężaru produktu wyjściowego i 91,8% w stosunku do jednostek.

Lepsze zrozumienie procesu, opisanego w przykładzie I, będzie możliwe po omówieniu rysunku. Rysunek przedstawia diagram elucji dla przykładu I, tj. wykres zależności gęstości optycznej przy 280 mμ różnych frakcji od ilości frakcji. Tak więc diagram wykazuje zawartość protein we frakcjach, zbieranych podczas procesu elucji. Podział frakcji na grupy, opisane w przykładzie I, jest uwidocznił za pomocą wykreślonych prostopadłych linii. Z diagramu wynika jasno, że produkt wyjściowy stanowi na ogół insulinę, a składnik insuliny jest skutecznie oddzielony od proinsuliny i podobnych protein.

Przykład II. Postępowano, jak w przykładzie I z wyjątkiem insuliny sodowej z wołu, którą zastąpiono 30 g insuliny sodowej ze świń, oraz zwiększono ilość 0,5 n kwasu octowego, w którym rozpuszczono insulinę, do 600 ml. Insulina sodowa ze świń wykazywała aktywność 23,3 jednostki/mg i zawartość proinsuliny 2,42% wagowych. Otrzymane wyniki podano w tablicy 2.

Tablica 2

Grupa	Objętość w ml	Frakcje	% ciał stałych ^a
A	1410	10—69	1,3
B-1	1200	70—119	2,7
B-2	820	120—154	6,0
C	1920	155—235	90,0

^a % wszystkich eluowanych substancji stałych

Z grupy C otrzymano 26,5 g cynk insuliny o aktywności 25,3 jednostki/mg i zawartości proinsuliny 0,57%. Tak więc wydajność cynk insuliny odpowiada 98,1% w stosunku do ciężaru surowca lub 95,9% jednostek.

Cynk insulinę, otrzymaną z tej samej porcji trzustki w procesie, w którym krystalizacja alkaliczna i chromatografia na żelu zostały zastąpione konwencjonalnym wytrącaniem izoelektrycznym z wodnego i wodnoalkoholowego rozpuszczalnika, otrzymano z tymi samymi wydajnościami na jednostkę wagi trzustki. Jednakże aktywność wynosiła 24,3 jednostki na mg, a zawartość proinsuliny 3,18%.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób oczyszczania insuliny w postaci soli metalu alkalicznego lub soli amonowej, **znamienny tym**, że żel o wymiarach cząsteczek mniejszych niż 100 mikronów i zawartości wody w stanie suchym co najmniej około 4% wagowych poddaje się spęcznianiu i spęcznionym żelem wypełnia kolumnę i następnie wprowadza wodny roztwór insuliny w postaci soli metalu alkalicznego lub soli amonowej o czystości co najmniej około 80%, przy czym stężenie insuliny wynosi 1—8% wagowych na objętość, całkowita ilość insuliny jest wystarczająca do wypełnienia kolumny w granicach 0,8—6,7 g/litr objętości złoża, przy czym pH roztworu wynosi 2,0—3,5, następnie eluuje się insulinę z kolumny w temperaturze 5—30°C wodnym roztworem eluanta o pH,

leżącym w tych samych granicach jak roztwór insuliny.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się żel o zawartości wody od około 4 do około 98%.

3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że stosuje się żel o zawartości wody 5—20%.

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

5. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że stosuje się żel o zawartości wody około 5%.

6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się żel o wielkości cząstek 20—80 mikronów.

7. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że kolumnę wypełnia się w granicach 3,5—5,0 g na litr objętości złoża.

8. Sposób według zastrz. 7, **znamienny tym**, że kolumnę wypełnia się około 4,5 g na litr objętości złoża.

