

28 grudnia 1926 r.

URZĄD PATENTOWY



A61k, 17/02

RZECZYPOSPOLITEJ POLSKIEJ

OPIS PATENTOWY

Nr 4259.

Kl. 30 h 3.

The Governors of the University of Toronto
(Toronto, Kanada).

Sposób wytwarzania środka przeciwcukrzycowego.

Zgłoszono 26 lutego 1924 r.

Udzielono 18 lutego 1926 r.

Pierwszeństwo: 2 marca 1923 r. (Stany Zjednoczone Ameryki).

Wynalazek niniejszy dotyczy wytwarzania w postaci stałej i skoncentrowanej pewnej substancji, posiadającej własności fizjologiczne i lecznicze zwalczania cukrzycy, odpowiadające własnościom zasady przeciwcukrzycowej, czyli hormonu, odgrywającego doniosłą rolę w procesie przetwarzania cukru w organizmie zwierzęcym i usuwającego główne objawy cukrzycy. Wynalazek polega na wytwarzaniu pomienionej substancji w postaci czystej, wolnej od zanieczyszczeń.

Inne zadanie wynalazku polega na wydzieleniu z trzustki metodą strącania czynnego składnika (hormonu) bez dodatku towarzyszących mu, a zanieczyszczających go lub jadowitych domieszek, zawierających związki azotowe, od których dotychczas niepodobna było oddzielić składnik ten tak

dokładnie, jak to pozwala uczynić sposób niniejszy.

Wiadomo było oddawna, że trzustka zwierząt lądowych oraz ryb chrząstkowych i odpowiednie gruczoły ryb ościstych wydzielają w postaci wydzieliny wewnętrznej czynną substancję hormonową, odgrywającą główną rolę w procesie przetwarzania cukru w organizmie zwierzęcym, przyczem objawy cukrzycy występują właśnie wtedy, gdy te wydzieliny ustają, albo są zbyt szczupłe. Dlatego też oddawna poszukiwano sposobu wydobycia z trzustki owego aktywnego czynnika w takiej postaci, aby można go było stosować z pomyślnym skutkiem przy zwalczaniu cukrzycy u ludzi. Dopiero jednak prace Banting'a, Best'a i Collip'a na uniwersytecie w Toronto dały wyniki poważniejsze.

Opracowana przez nich metoda opiera się zasadniczo na zabiegach następujących.

1) Wyciąganie soku trzustkowego, z nim zawarty w nim składnik czynny, hormon, nie uległ zniszczeniu pod wpływem trypsyny i innych enzymów. Do tego celu służył rozpuszczalnik, który bądźto nie zawierał trypsyny i innych enzymów, bądź pozabawiał je szkodliwego ich działania na hormon przeciwcukrzycowy.

2) Zmienianie stężenia roztworów za pomocą rozpuszczalnika pierwotnego lub wtórnego albo obu tych rozpuszczalników i odpowiedniego przesączania, w celu strącania cząstkowego poszczególnych wyciągniętych składników. Do cząstkowego strącania stosowano z dobrymi wynikami alkohol i csaad, powstający przez strącanie alkoholem 80% do 90%, zawierał po usunięciu zeń osadów, powstających przy większych rozcieńczeniach spirytusu, największą stosunkowo ilość składnika czynnego—hormonu przeciwcukrzycowego.

3) Rozpuszczanie zawierającego hormon osadu w wodzie.

4) Ustalanie stopnia aktywności przeciwcukrzycowej otrzymanego roztworu, przyczem za jednostkę przyjmowano taką ilość roztworu, jaka po zastrzyknięciu normalnemu królikowi, ważącemu 1 kg, obniżała zawartość cukru we krwi poniżej 0,045% w ciągu sześciu godzin, wywołując przytem konwulsje.

Produkt otrzymywany sposobem powyższym zawierał na jednostkę aktywności przeciwcukrzycowej w najlepszym razie od 0,2 do 1,0 mg azotu, ale częstokroć bywało go znacznie więcej, a poza tem napotymano w preparacie sole nieorganiczne. Preparat bywał bardzo często nietrwały i rozkładał się w nieoczekiwanych i nieprzewidzianych zgóry warunkach. Nie można więc było liczyć z pewnością na jego skuteczność. Podczas gdy sam już hormon zawiera prawdopodobnie azot, zanieczyszczenia, o jakich mowa, składały się prawie wyłącznie z protein i ze związków,

powstających wskutek ich rozszczepienia, co prowadziło do niepożądanych objawów, jak bolesność i stwardnienie przy zastrzykiwaniu. Zanieczyszczenia zawierały poza tem substancje fosforowe, oraz substancje grup purynowej i pyrimidynowej.

Nowa metoda pozwala wytwarzać produkt, który można stosować bez zastrzeżeń i bez zawodu przy zwalczaniu cukrzycy. Produkt ten odznacza się stałością i nie wykazuje zmian po upływie nawet trzech lub więcej miesięcy. Preparat tak jest czysty, że tysiące pacjentów, którym go stosowano, a między innemi i tacy, którzy doświadczaali bólu i kurczów przy najlepszych nawet preparatach dawniejszych, nie odczuwali w tym wypadku najmniejszej bolesności.

Metoda niniejsza polega na procesie strącania czynnej substancji przeciwcukrzycowej w bardzo czystym i nie ulegającym rozkładowi stanie z roztworu, zawierającego zwykle zanieczyszczenia składnika, o który nam chodzi. Resztki azotu w preparacie stanowią znacznie mniejszy odsetek i nie przewyższają 0,1 mg na jednostkę aktywności przeciwcukrzycowej preparatu, a bardzo często stanowią zaledwie 0,005 do 0,05 mg na jednostkę pomienionej aktywności. Tak małej zawartości azotu dotychczas nie osiągnano nigdy w preparatach dawniejszych, gdyż zawsze przekraczała ona 0,1 mg na jednostkę. Dla otrzymania takiej czystości konieczne jest wielokrotne strącanie. Otrzymuje się przytem różnorodne zawartości azotu. Po osiągnięciu jednak pewnego kresu dalsze powtarzanie zabiegu nie prowadzi już do doskonalszego oczyszczenia. Preparat i jego roztwory nie zawierają przytem domieszek rozpuszczalnych w wodzie, a więc soli nieorganicznych, fosforu i substancyj grup puryny i piramidyny, które zawierają nieuniknienie preparaty dotychczasowe. Ostateczny roztwór jest zupełnie przezroczysty i w niewielkich ilościach zupełnie bezbarwny, jak woda. Preparaty dawniejsze były zawsze zlekka zabarwione.

Czystość nowego preparatu zależy widocznie od tego, że osad „substancji antydjabetycznej” zawiera wyłącznie hormon i pewne blisko z nim spokrewnione substancje, które nie wywołują ujemnego wpływu ani na stałość preparatu, ani na jego siłę i własności aktywne przy zwalczaniu cukrzycy. Cała masa zanieczyszczeń (proteiny, produkty rozczepienia protein, inne związki azotowe, sole nieorganiczne i t. p.) pozostają w roztworze i zostają oddzielone od produktu.

Ze względu na znaczną czystość, skuteczność preparatu zależy prawie wyłącznie od stopnia rozwoju choroby i stosowanie jego nie pociąga za sobą niepożądanych zjawisk twardnienia i bolesności.

Do oczyszczenia preparatu mogą prowadzić różne metody. Najodpowiedniejszą jest metoda, polegająca na przystosowaniu koncentracji jonów wodoru w zawierającym hormon roztworze do pewnego izoelektrycznego punktu, w jakim następuje strącanie osadu, zawierającego hormon lub połączonego z tą substancją.

Banting, Best i Collip stosowali, jak wiadomo, w swych pracach zasadę strącania izoelektrycznego. Posługiwali się nią jednak do rozmaitych celów i otrzymywali niejednolite wyniki. Przedewszystkiem pragnęli ją zastosować do strącania z roztworu niepożądanych zanieczyszczeń w tym celu, aby w roztworze pozostawić czysty hormon przeciwcukrzycowy. W metodzie niniejszej sposób ten służy przeciwnie do strącenia czystego hormonu i pozostawienia wszystkich domieszek w stanie rozpuszczonym. Usiłowania w tym kierunku można uważać za skuteczne, o ile uda się na tej drodze wyeliminować wszelkie zanieczyszczenia.

Okazało się dalej, że rozczyń, który poprzednio stanowił produkt ostateczny, może ulegać pod względem swej stałości szkodliwym wpływom jonów wodoru. Jeżeli koncentracja jonów wodoru znajduje się w szeregu P_H w granicach 4 do 7, następuje

niszczenie aktywności preparatu w stopniu zależnym od koncentracji jonów wodoru.

Większa jednak część masy preparatu nie stanowi zubożonego hormonu. Następuje rozkład samego preparatu i tworzy się powoli osad hormonu, co w dalszym ciągu osłabia aktywność roztworu. Szybkość tworzenia się takich osadów zależy od koncentracji jonów wodoru i wzrasta w miarę zbliżania się z tej lub owej strony do punktu izoelektrycznego. Po ustaleniu tego punktu powstawanie osadu zostaje przyspieszone, a wydajność jego wzrasta tem silniej, im roztwór zawiera mniej zanieczyszczeń. Osad w sprzyjających warunkach zaczyna się tworzyć, gdy P_H odpowiada 4, wydziela się najszybciej przy P_H wynoszącym od 4,5 do 5,5, a rozpuszcza się prawie całkowicie zpowrotem przy P_H wynoszącym od 6,5 do 7. Wyjątek stanowią roztwory tak zanieczyszczone, że osad, który w innych warunkach zacząłby się tworzyć, pozostaje w roztworze. W takich razach należy roztwór rozcieńczyć i osad znacznie się wydzielać.

Metoda niniejsza może przeto posłużyć się dla otrzymania stałych i czystych substancji antycukrzycowych sposobem, który poprzednio był przyczyną poważnych trudności.

Można jednak postępować inaczej. Zaleca się rozpoczynać pracę z preparatami przygotowanymi według jednego ze sposobów znanych dawniej. Chodzi o to, że strącanie hormonu na drodze izoelektrycznej zostaje znacznie ułatwione, jeżeli składnik ten pozbawi się znacznej części jego zanieczyszczeń. Nową metodę można stosować w obu wypadkach. Jeżeli jednak stosować ją tylko do oczyszczania preparatów już przygotowanych, to przy pomocy jej można otrzymać wyniki znacznie korzystniejsze, dzięki usunięciu domieszek szkodliwych metodami znanymi.

Koncentracja jonów wodoru według najkorzystniejszej metody—o ile oczyszcza

się dawniejsze preparaty ostateczne—ustala się w ten sposób, by strąceniu uległ jedynie składnik czynny w możliwie czystym i stałym stanie. Koncentrację jonów ustala się przeto możliwie blisko punktu izoelektrycznego substancji lub substancyj, zawierających po osadzeniu z roztworu hormon lub towarzyszących hormonowi przeciwcukrzycowemu bez względu na to, czy substancje te stanowią hormon, czy też go nie zawierają. W tym punkcie P_H odpowiada granicom od 4 do 7. Określenie „substancja przeciwcukrzycowa” oznacza w opisie i w niektórych zastrzeżeniach ogólnie hormon przeciwcukrzycowy czy to sam, czy łącznie z pewnemi innemi substancjami, pochodzącymi z wyciągania trzusk. Dawniejsze produkty (roztwory) ostateczne można doprowadzić do pożądaných granic P_H przez odpowiednie uzupełnienie procesu pierwotnego. Jeżeli wartość P_H była od początku zbyt niska, to można ją podnieść przez dodatek alkaliów, najkorzystniej wodorotlenku sodowego, dopóki nie osiągnie się bliskości punktu izoelektrycznego. Skoro natomiast była ona za wysoka, należy dodać kwasu, najlepiej solnego. W chwili powstawania osadu może nastąpić zmiana w koncentracji jonów wodoru, niema jednak potrzeby utrzymywania stałej wartości P_H , gdyż aczkolwiek punkt izoelektryczny zdaje się leżeć w granicach od 4,5 do 5,5 skali P_H , osad w mniejszym lub większym stopniu powstaje w granicach P_H od 4 do 7, co pozwala przeto stosować koncentrację jonów w tych właśnie granicach. Najlepsze wyniki daje utrzymywanie jej w granicach od 4,5 do 5,5. Po ustaleniu P_H jak najbliższej punktu izoelektrycznego pozostawia się roztwór w spokoju dla ułatwienia powstawania osadu. Potrzeba na to kilka dni albo i całego tygodnia, chociaż częściowo wydzielający się osad powstaje już po kilku godzinach. Jeżeli osad wydziela się zbyt wolno, albo nie powstaje wcale, należy roztwór rozcieńczyć, podtrzymując taką kon-

centrację jonów, jaka jest potrzebna do wywołania osadu. Osad należy od czasu do czasu usuwać, a jednocześnie koncentrację jonów miarkować dla zachowania wskazanego powyżej optimum P_H , co ułatwia dalsze wydzielanie się osadu. Bardzo korzystnym bywa również studzenie roztworu podczas odstawiania.

Osady, otrzymane w ten sposób, rozpuszczają się w wodzie, zawierającej kwas albo zasadę. W roli kwasu najodpowiedniejszym jest solny, w roli zasady—wodorotlenek sodu. W takim roztworze preparat jest gotów do zastrzykiwań. Koncentracja jonów wodoru P_H w tym roztworze ustala się na wartość dowolną. Wartość ta leży zazwyczaj zewnątrz granic znaczeń, wywołujących powstawanie osadu, hormon pozostaje przeto w roztworze. Dla zwykłych celów leczniczych wystarcza wartość $P_H = 3,5$, można jednak stosować niższe jego wartości. W wielu wypadkach najkorzystniej bywa stosować koncentrację P_H o wartości 2, której kwas, w razie posługiwania się kwasem solnym, nie wywołuje przy zastrzykiwaniu wrażenia ukłucia. W pewnych wypadkach można stosować i znacznie wyższe wartości P_H , w sąsiedztwie punktu izoelektrycznego albo dalekie odczyty, dochodząc aż do 12.

Według nowej metody otrzymuje się do 90% całkowitej zawartości czynnej substancji przeciwcukrzycowej, zawartej w przerabianym roztworze przed strąceniem. Zależy to od dokładności procesu strącania, od czystości pierwotnego materiału, okresu odstawiania się roztworu, chłodzenia roztworu podczas wydzielania osadu, a przede wszystkim od traktowania roztworu w warunkach bliskich punktu izoelektrycznego. Jeżeli przestrzegać wymienionych warunków, to można uniknąć większych strat w skuteczności przeciwcukrzycowej. W każdym razie wygrywa się ogromnie na trwałości i czystości otrzymanego na tej drodze produktu.

Zastrzeżenia patentowe.

1. Sposób wytwarzania środka przeciwcukrzycowego z trzustki, znamienny tem, że trzustkę obrabia się rozpuszczalnikiem, pochłaniającym czynną zasadę przeciwcukrzycową czyli hormon bez niszczenia go i powstrzymującym to zniszczenie zapomocą substancyj początkowo połączonych z hormonem w trzustce, roztwór oddziela się od pozostałości trzustki, oddziela hormon od zanieczyszczeń zapomocą strącania cząstkowego i stężenie alkoholu zmienia frakcje otrzymane pomiędzy 80° i 90° alkoholu, oddziela się roztwór pomienionej frakcji i reguluje koncentrację jonów wodoru ostatniego tego roztworu tak, aby P_H zawierało się między 4 i 7 celem wytworzenia osadu zawierającego zasadę przeciwcukrzycową i wreszcie oddziela się i zabezpiecza osad otrzymany w ten sposób.

2. Sposób wytwarzania środka przeciwcukrzycowego i oddzielania czynnej zasady przeciwcukrzycowej czyli hormonu z trzustki od zanieczyszczeń, z którymi był on pierwotnie połączony w trzustce, według zastrz. 1, znamienny tem, że koncentrację jonów wodorowych roztworu zawierającego pomienioną zasadę przeciwcukrzycową czyli hormonu, dobiera się tak, aby P_H zawierało się między 4 i 7 celem wytworzenia osadu zawierającego hormon przeciwcukrzycowy, a następnie oddziela i zabezpiecza wytworzony osad.

3. Sposób wytwarzania środka przeciwcukrzycowego i oczyszczania przetworu, zawierającego czynną zasadę przeciwcukrzycową czyli hormon trzustkowy, według zastrz. 1 i 2, znamienny tem, że z oddzielnego osadu wytwarza się roztwór posiadający koncentrację jonów wodoru zewnątrz P_H od 4 do 7 dla zapobieżenia osiadanu zasady przeciwcukrzycowej czyli hormonu z roztworu.

4. Sposób wytwarzania środka przeciwcukrzycowego i oczyszczania czynnej zasady przeciwcukrzycowej czyli hormonu z trzustki według zastrz. 2, znamienny tem, że koncentrację jonów wodoru ustala się na $P_H = 5 \pm 0,5$ celem wytworzenia osadu zawierającego pomieniony hormon lecz pozostawiającego w roztworze zanieczyszczające substancje azotowe a następnie oddziela się od roztworu.

5. Sposób wytwarzania środka przeciwcukrzycowego i oczyszczania czynnej zasady przeciwcukrzycowej czyli hormonu według zastrz. 1—4, znamienny tem, że wytwarza się roztwór ostatecznego osadu o koncentracji jonów wodorowych tak, aby P_H pozostawało poniżej 4-ch.

The Governors of the
University of Toronto.
Zastępca: M. Skrzykowski,
rzecznik patentowy.