



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

219407
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
A 61 K 37/26

(22) Přihlášeno 23 10 62
(21) (PV 5999-62)

(40) Zveřejněno

(45) Vydáno 15 08 85

(75)

Autor vynálezu

PÁDR ZDENĚK RNDr., RÁBEK VLASTIMIL RNDr., PLEŠEK JAROMÍR
dr. ing., VOLEK MILAN ing., PRAHA

(54) Způsob izolace inzulínu

1

Vynález se týká způsobu izolace inzulínu a dalších biologicky účinných peptidických látek z extraktů pankreatu adsorpcí na syntetických nerozpustných makromolekulárních pryskyřicích.

Při veškerých dosavadních způsobech izolace inzulínu se postupuje tak, že se rozemletý hovězí nebo vepřový pankreas extrahuje okyseleným 50–70 %ním ethanolem. V uvedeném extrakčním činidle je inzulín nejlépe rozpustný, přičemž je též účinně chráněn před proteolytickým štěpením enzymy, přítomnými v pankreatu. V dalších fázích se extrakt vyčistí filtrací nebo odstředěním, zpravidla po úpravě do slabě alkalické oblasti pH a po opětovném okyselení se vakuum destilací odežene ethanol. Zahušťuje se na 1/10 až 1/15 původního objemu, přičemž se ze zbývajících vodného roztoku vyloučí vrstva lipidů. Odstranění této vrstvy činí obvykle značné potíže, nehledě k současným ztrátám inzulínu. Z čirého filtrátu se potom inzulín vysolí a podrobuje dalšímu čištění, které je ukončeno krystalizací.

Snahy o zjednodušení dosud obvyklé technologie (náhrada zahušťování velkých objemů ethanolického extraktu ve vakuu, odstraňování lipidů), vedly k vypracování nových metod, používajících iontoměničů. Například Jorpes se sp. izoluje inzulín z ex-

2

traktu adsorpcí na přirozeném měničích iontů, alginové kyselině (západoněmecký pat. spis č. 1 043 584). Při tomto způsobu se vychází z kyselého extraktu, který se po alkalické úpravě opět upraví do kyselé oblasti na pH 3,0–4,7 a uvede do styku s přirozeným měničím iontů, alginovou či pektinovou kyselinou, popřípadě oxycelulosou, na který se inzulín obsažený v extraktu adsorbuje. Po oddělení měniče se inzulín eluuje vodnou 0,3 N kyselinou chlorovodíkovou.

V pat. spise výtěžky uvedeny nejsou, v souběžné publikaci (Acta chem. scand. 14, 1777, 1960) uváděné výtěžky jsou značně nízké, přibližně 800–1000 m.j. inzulínu z 1 kg hovězího pankreatu a 4000 m.j. z 1 kg telecího pankreatu, což nedosahuje ani polovinu množství inzulínu obsaženého ve žláze. Z provozního hlediska je tato metoda značně neekonomická.

Předmětem vynálezu je další zdokonalení a zjednodušení technologie izolace inzulínu, a to i metody používající měničů iontů.

Podstata tohoto způsobu, který je vhodný též k izolaci dalších biologicky aktivních peptidických látek z extraktů pankreatu, spočívá v tom, že se izolace provádí ze surového vyčištěného extraktu s hodnotou pH 6–8, s výhodou 6,5–7,0, adsorpcí na iontoměničích, obsahujících skupiny $-\text{COOH}$,

—CH₂COOH nebo —CHOH.COOH, na bázi esterů kyseliny akrylové nebo methakrylové s dioly, kopolymerovaných s 0,5 — 5 % síťovadla, jako je divinylbenzen nebo dimethakrylát, a s neutrálním monomermem, jako jsou estery kyseliny akrylové, methakrylové nebo maleinové, popřípadě styren, načež se naadsorbovaný inzulin a další biologicky aktivní peptidické látky z iontoměniče eluují.

Eluce z iontoměniče se provádí nejlépe vodným alkanolem s 1 až 3 atomy uhlíku, s výhodou ethanolem, obsahujícím 0,3—3,0 % s výhodou 1,0 %, kyseliny chlorovodíkové, sírové nebo fosforečné.

Optimálního efektu adsorpce se dosáhne při použití iontoměničů s makroporézní houbovitou strukturou.

Při provedení způsobu podle vynálezu dochází k adsorpci inzulinu a dalších biologicky aktivních peptidických látek na iontoměničích uvedeného složení a vlastností pouze z neutrálního prostředí, s optimem při pH 6,5 až 7,0, které je nešetrnější.

V prostředí kyselém, jako je tomu při použití kyseliny alginové, adsorpce nenastává. Eluce se provádí 30—70%ním ethanolem, okyselením kyselinou na příslušné pH, optimálně probíhá s 50—60%ním ethanolem, obsahujícím 1 % HCl. Na rozdíl od kyseliny alginové a jiných přirozených iontoměničů nedochází k eluci ze syntetického iontoměniče pouhou vodnou zředěnou kyselinou, přítomnost alkoholu v elučním činidle je nutná.

Ze získaného eluátu se ve vakuu odpaří ethanol a z odparku se potom již běžným způsobem vysolí přidavkem NaCl inzulin, který se dále čistí a nakonec krystaluje.

Je samozřejmé, že všechny typy karboxylových katexů nejsou stejně vhodné pro izolaci inzulinu ze surových extraktů. Záleží především na tom, jak rychle se ustavuje rovnováha. Předpokladem úspěšné adsorpce a eluce vysokomolekulárních látek, je možnost jejich proniknutí do částic pryskyřic nebo vhodným způsobem zvětšený povrch částic a přítomnost pouze takových funkčních skupin, které nepoutají adsorbovanou látku příliš pevně.

Jmenovaným požadavkům vyhovují nejlé-

pe slabě zesíťované karboxylové katexy, obsahující 0,5 — 5,0 % síťovadla, jejichž vlastností, například bobtnavost, lze podle potřeby modifikovat volbou vhodných složek. Kapacitu iontoměničů lze dále zvýšit jejich úpravou do formy makroporézní houbovité struktury. U takových pryskyřic se při zachování makroskopicky pravidelného tvaru částic silně zvětší aktivní povrch a není pak zapotřebí, aby peptidická makromolekulární látka musela pronikat dovnitř pryskyřice. Další výhodou uvedeného typu syntetických pryskyřic je to, že spojují v sobě vlastnosti pro izolaci polypeptidů, tj. vlastnosti iontoměnné s vlastnostmi gelového filtru.

Adsorpce inzulinu není v podstatě závislá na titrační kapacitě iontoměniče, rozhodující je množství síťovadla, velikosti částic, houbovitost struktury, doba adsorpce, množství měniče a koncentrace vodíkových iontů.

Příklad provedení

10 kg zmraženého hovězího nebo vepřového pankreatu se rozměle přímo do 21,5 litru 96%ního ethanolu, okyseleného 225 mililitry kyseliny fosforečné. Míchá se 2 hodiny při teplotě místnosti, potom se drť oddělí a opět extrahuje 2 hodiny 20 litry 60 až 65%ního ethanolu, okyseleného 90 ml kyseliny fosforečné. Filtráty se spojí a vyčistí na odstředivce. Potom se pH upraví na 6,5—7,0 (roztokem hydroxidu sodného, amoniakem apod.) a vzniklá sraženina se oddělí. K čirému filtrátu se přidá 400 g karboxylového katexu v H-cyklu a mírně se míchá 2—16 hodin. Po ukončení míchání klesne katex ke dnu. Katex se oddělí od kapalného podílu a eluuje za míchání 500 mililitrů 60%ního ethanolu, okyseleného 15 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Po 15—30 minutách míchání se katex odfiltruje a eluuje obdobně ještě jednou. Eluáty se spojí, ethanol se oddestiluje ve vakuu a z vodného média se inzulin vysolí přidavkem NaCl do koncentrace 25 až 28 % a dále zpracovává některou z obvyklých metod.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob izolace inzulinu a dalších biologicky aktivních peptidických látek z extraktů pankreatu adsorpcí na syntetických nerozpustných makromolekulárních pryskyřicích, obsahujících karboxylové skupiny, vyznačující se tím, že se izolace provádí ze surového vyčiřeného extraktu s hodnotou pH 6—8, s výhodou 6,5—7,0, adsorpcí na iontoměničích, obsahujících skupiny $-\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{COOH}$ nebo $-\text{CHOH}.\text{COOH}$, na bázi esterů kyseliny akrylové nebo methakrylové s dioly, kopolymerovaných s 0,5 až 5,0 % sířovadla, jako je divinylbenzen nebo dimethakrylát, a s neutrálním monome-

rem, jako jsou estery kyseliny akrylové, methakrylové nebo maleinové, popřípadě styren, načež se naadsorbovaný inzulin a další biologicky aktivní peptidické látky z iontoměniče eluují.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se eluce z iontoměniče provádí vodným alkanolem s 1—3 atomy uhlíku, s výhodou ethanolem, obsahujícím 0,3—3,0 %, s výhodou 1,0 % kyseliny chlorovodíkové, sírové nebo fosforečné.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se používá iontoměničů s makropórní houbovitou strukturou.