

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

**O P I S P A T E N T O W Y
PATENTU TYMCZASOWEGO**

70 072

Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu _____

Kl. 30h, 2/10

Zgłoszono: 07.12.1970 (P. 144838)

Pierwszeństwo: _____

MKP A61k 17/04

Zgłoszenie ogłoszono: 05.05.1973

Opis patentowy opublikowano: 15.03.1974

Twórcy wynalazku: Arnold Adamiec, Janina Grzegorzewska, Mieczysław
Łukaszewski, Kazimierz Samuła, Irena Zarębska

Uprawniony z patentu tymczasowego: Instytut Przemysłu Farmaceutycznego,
Warszawa (Polska)

Sposób wyodrębniania hormonów peptydowych z gruczołów trzustki

Przedmiotem wynalazku jest sposób wyodrębniania hormonów peptydowych ze zwierzęcych gruczołów trzustkowych. Hormony takie jak np. insulina i glukagen mają zastosowanie w medycynie jako środki lecznicze.

Znany sposób wyodrębniania tych hormonów polega na szybkim zamrożeniu świeżo wyjętych z zabitego zwierzęcia gruczołów trzustkowych w temperaturze niższej niż 0°C , np. w temperaturze -30°C , a następnie na rozdrobnieniu gruczołów w odpowiednich urządzeniach rozdrabniających i użyciu rozdrobnionych gruczołów bezpośrednio po ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi i dalszego przerobu ekstraktu według ogólnie znanych metod. Sposób ten nie prowadzi do całkowitego wyodrębnienia hormonów peptydowych i pełnego wykorzystania tak cennego i deficytowego surowca, jakim są trzustkowe gruczoły zwierzęce.

Inny korzystniejszy sposób opisany w opisie patentowym nr 67736 polega głównie na tym, że gruczoły trzustkowe poddaje się działaniu wodnego roztworu soli organicznych oraz nieorganicznych w temperaturze -5°C — $+5^{\circ}\text{C}$ w ciągu 10 minut do 5 godzin, a następnie w ogólnie znany sposób ekstrahuje się rozpuszczalnikami organicznymi po uprzednim oziębieniu do temperatury -80°C — $+5^{\circ}\text{C}$.

Stwierdzono obecnie, że gruczoły trzustkowe można poddać działaniu wodnych roztworów soli w zakresie temperatur wygodniejszym niż -5°C — $+5^{\circ}\text{C}$, a mianowicie w temperaturze pokojowej lub wyższej, stosując odpowiednio krótszy czas działania tych soli. Stwierdzono również, że oziębienie gruczołów trzustki do temperatury -80°C — $+5^{\circ}\text{C}$ przed ekstrakcją rozpuszczalnikami organicznymi jest zbędne. Unika się w ten sposób kosztownych urządzeń chłodzących i zwiększa przelotowość aparatury, przy czym osiągnięte wydajności są podobne lub nieco wyższe niż w sposobie opisanym w opisie patentowym nr 67736.

Według wynalazku, świeżo wyjęte z zabitych zwierząt gruczoły trzustkowe poddaje się działaniu wodnego roztworu soli w temperaturze $+5^{\circ}\text{C}$ — $+50^{\circ}\text{C}$ w ciągu 1/2 minuty do 10 minut, po czym przygotowane w ten sposób gruczoły oddziela się od roztworu soli, oziębia i przechowuje w temperaturze -80°C — $+5^{\circ}\text{C}$. Następnie w dogodnym momencie gruczoły rozdrabnia się, miele, doprowadza do temperatury -5°C — $+50^{\circ}\text{C}$, pozostawia w tej temperaturze w ciągu 1/2 minuty do 5 godzin i w znany sposób poddaje się je ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi. W podanych zakresach temperatur czas jest tym krótszy, im wyższa temperatura i większe stężenie roztworu soli.

Do sporządzania wodnego roztworu soli używa się soli nieorganicznych oraz/lub organicznych, w których kationem jest pierwiastek należący do I-III grupy układu okresowego lub amonu, w skład anionu wchodzi pierwiastek należący do V-VII grupy układu okresowego lub tworzy go reszta kwasu organicznego zawierającego 1-3 grup karboksylowych w cząsteczce, przy czym kwas ten może być jedno- lub wielofunkcyjny, taki jak aminokwas lub hydroksykwas. Do sporządzania roztworu wodnego soli mogą więc być użyte różnorodne sole, takie jak np. fosforan potasowy dwuzasadowy, fosforan jednoamionowy, chlorek potasowy, octan sodowy, glicynian sodowy, cytrynian amonowy, chlorek wapniowy, mleczan wapniowy, chlorek glinowy, siarczan bizmutawy, siarczan glinowo-potasowy, chlorek żelazowy, siarczan żelazawy, cytrynian żelazowy, octan ołowiawy, mleczan ołowiawy, przy czym w skład roztworu soli może wchodzić zarówno pojedyncza sól, jak i mieszanina soli nieorganicznych oraz/lub organicznych.

Stężenie roztworu soli może być zawarte w szerokich granicach i wynosi 1-500 g/l, korzystnie 50-250 g/l. Stosuje się przy tym 0,5-10 objętości roztworu soli, korzystnie 2-4 objętości roztworu soli na 1 objętość świeżego gruczołu trzustkowego i 0,05-1 objętości roztworu soli, korzystnie 0,1-0,3 objętości roztworu soli na 1 objętość zmielonego gruczołu trzustkowego.

Bezpośrednie traktowanie świeżo wyjętych gruczołów trzustkowych wodnym roztworem soli w praktycznej realizacji wynalazku może napotykać trudności. W związku z tym może się okazać korzystne zastosowanie odmiany sposobu według wynalazku polegającej na tym, że świeżo wyjęte z zabitych zwierząt gruczoły trzustkowe najpierw oziębia się i przechowuje w temperaturze $-80^{\circ}\text{C} - +5^{\circ}\text{C}$, a następnie gruczoły rozdrabnia się i miele i poddaje działaniu wodnego roztworu soli w temperaturze $-5^{\circ}\text{C} - +50^{\circ}\text{C}$ w ciągu 1/2 minuty do 10 minut, po czym zmacerowaną w ten sposób tkankę gruczołów trzustkowych w znany sposób poddaje się ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi.

Przykład I. 2 kg świeżo wyjętych z zabitych zwierząt gruczołów trzustkowych zanurzano w 5 l 10% roztworu o temperaturze 10°C , zawierającego siarczan żelazawy i octan sodowy w stosunku molowym 0,05 : 1, na przeciąg 9 minut, po czym oddzielono roztwór soli, a gruczoły oziębiono i przechowywano w temperaturze -25°C . Po upływie 48 godzin gruczoły rozdrobniono na łamaczu szczękowym i zmielono w młynku, po czym temperaturę ich doprowadzono do $+5^{\circ}\text{C}$ i pozostawiono w tej temperaturze w ciągu 30 minut. Następnie tak zmacerowaną tkankę gruczołów trzustkowych zadano w ekstraktorze 5 l alkoholu etylowego z dodatkiem 20 ml 85% kwasu fosforowego. Ekstrakcję prowadzono w ciągu 3 godzin, po czym ekstrakt alkoholowy oddzielono przez odwirowanie. Pozostałość ponownie ekstrahowano 70% alkoholem etylowym w ilości 3,5 l i odwirowano. Połączone ekstrakty zalkalizowano 15% amoniakiem do wartości $\text{pH} = 7,8-8,2$. Wydzielony osad szybko odsączono, a ekstrakt zakwaszono 10% kwasem solnym do wartości $\text{pH} = 3,5$. Alkohol odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze, nie przekraczającej 35°C . Wydzielony tłuszcz usunięto przez sączenie za pomocą celitu. Surową insulinę wysolono, stosując 20% nasycenia chlorkiem sodowym, po czym poddano ją oczyszczeniu i krystalizacji za pomocą buforu cytrynianowego. Uzyskano 280 mg czystej insuliny o mocy 24 j.m./mg.

Przykład II. 2 kg świeżo wyjętych z zabitych zwierząt gruczołów trzustkowych zamrożono szybko w temperaturze -30°C i przechowano w tej temperaturze do następnego dnia. Następnie gruczoły trzustkowe rozdrobniono na łamaczu szczękowym, zmielono w młynku przy równoczesnym dodaniu 200 ml 20% roztworu zawierającego fosforan jednoamionowy, chlorek magnezowy, chlorek potasowy i glicynian sodowy w stosunku molowym 1 : 1 : 2 : 2, utrzymując mieszaninę w temperaturze $+7^{\circ}\text{C}$ w ciągu 9 minut. Zmacerowaną w ten sposób tkankę gruczołów trzustkowych załadowano do ekstraktora i postępowano tak, jak podano w przykładzie I. Uzyskano 276 mg czystej insuliny o mocy 24,3 j.m./mg.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wyodrębniania hormonów peptydowych ze zwierzęcych gruczołów trzustkowych przez bezpośrednie poddawanie gruczołów działaniu roztworu soli, oddzielenie roztworu soli, przechowywanie gruczołów w temperaturze $-80^{\circ}\text{C} - +5^{\circ}\text{C}$, rozdrobnienie i ekstrakcję rozpuszczalnikami organicznymi lub przechowywanie gruczołów w temperaturze $-80^{\circ}\text{C} - +5^{\circ}\text{C}$, rozdrobnienie, poddanie działaniu roztworu soli i ekstrakcję gruczołów rozpuszczalnikami organicznymi, **znamienny tym**, że gruczoły poddaje się działaniu roztworu soli w temperaturze $+5^{\circ}\text{C} - +50^{\circ}\text{C}$ w ciągu 1/2 minuty do 10 minut, przy czym im wyższa temperatura i większe stężenie roztworu, tym krótszy czas działania.