



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl.³: C 07 G 15/00

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978



⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑪

634 854

②① Gesuchsnummer:	15345/76	⑦③ Inhaber:	Dr. Hellmut Mittenzwei, München 80 (DE)
②② Anmeldungsdatum:	07.12.1976		
③① Priorität(en):	24.12.1975 DE 2558537	⑦② Erfinder:	Dr. Hellmut Mittenzwei, München 80 (DE) 03 Erfinder haben auf Nennung verzichtet
②④ Patent erteilt:	28.02.1983		
④⑤ Patentschrift veröffentlicht:	28.02.1983	⑦④ Vertreter:	Scheidegger, Zwicky & Co., Zürich

⑤④ **Verfahren zur Herstellung organopeptidhaltiger Substanzen mit insulinähnlicher Wirksamkeit aus Blut oder Blutbestandteilen.**

⑤⑦ Nach diesem Verfahren werden aus Eiweisskörpern von Blut-Ausgangsmaterial, wie Gesamtblut, Plasma, Serum, Erythrocyten- und/oder Thrombocyten-Suspension, durch Einstellen des pH-Wertes auf 2 bis 4 oder 8 bis 10, Weiterbehandlung des Materials bei 15 bis 40°C während einer Inkubationszeit von wenigstens 4 Stunden, Abkühlen auf 10°C und Neutralisation über chemische, chemisch-physikalische und enzymatische Prozesse organopeptidhaltige Substanzen mit insulinähnlicher Wirksamkeit gewonnen.

Eine vorgängige Verdünnung des Ausgangsmaterials mit einem hydrophilen Lösungsmittel setzt weitere Eiweisskörper aus dem Ausgangsmaterial frei und erhöht die Bildung solcher Substanzen.

Die gewonnenen Substanzen haben ein Molekulargewicht von 350 bis 5000 und eine insulinähnliche Aktivität von 14 bis 40 µE/mg, was eine beachtliche Erhöhung der sonst allenfalls im Blut oder Serum enthaltenen 2,5 bis 8,5 µE/mg Feststoff an solchen Substanzen bedeutet.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung organopeptidhaltiger Substanzen mit insulinähnlicher Wirksamkeit aus Blut oder Blutbestandteilen warmblütiger Tiere, dadurch gekennzeichnet, dass man das Blut oder die Blutbestandteile durch Einstellen des pH-Wertes auf 2 bis 4 oder auf 8 bis 10 vorbehandelt, das so vorbehandelte Blutmaterial über eine Zeitspanne von wenigstens vier Stunden auf 15 bis 40°C hält, das auf diese Weise inkubierte Blutmaterial auf eine Temperatur von weniger als 10°C abkühlt und aus dem behandelten Blutmaterial nach Neutralisation die so hergestellten organopeptidhaltigen Substanzen mit insulinähnlicher Wirksamkeit mit einem Molekulargewicht von 350 bis 5000 und einer insulinähnlichen Aktivität von 14 bis 40 $\mu\text{E}/\text{mg}$ Feststoff gewinnt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man das Blut oder die Blutbestandteile vor der Einstellung des pH-Wertes mit 0,5 bis 4 Volumina eines hydrophilen Lösungsmittel verdünnt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass man als Blut oder Blutbestandteile Gesamtblut, Plasma, Serum, Erythrocytensuspension und/oder Thrombocyten suspension verwendet.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass man als Blut oder Blutbestandteile den nach Entfernen anorganischer und organischer Substanzen mit einem Molekulargewicht von weniger als 5000 aus dem Blut oder den Blutbestandteilen erhaltenen Rückstand verwendet.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass man als Blut oder Blutbestandteile den nach Entfernen anorganischer und organischer Substanzen mit einem Molekulargewicht von weniger als 1000 aus dem Blut oder den Blutbestandteilen erhaltenen Rückstand verwendet.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass man die Substanzen mit insulinähnlicher Wirksamkeit aus dem behandelten Blut oder den Blutbestandteilen durch Dialysieren gegen eine für ein Molekulargewicht von weniger als 5000 durchlässige Membran als Aussendialysat gewinnt.

Es ist bekannt, dass bestimmte aus dem Blut warmblütiger Tiere gewonnene Substanzen neben anderen Wirkungen, wie einer atmungsstimulierenden Wirkung und einer wachstumsfördernden Wirkung, auch über eine gewisse insulinähnliche Wirksamkeit verfügen. Eine solche insulinähnliche Wirksamkeit besitzen beispielsweise die in *Arzneim. Forsch.* 18, 1019 (1968) sowie in *J. Cell. Physiol.* 79, 319 (1972) beschriebenen Produkte, bei denen es sich um ein nach Spezialverfahren aus dem Blut warmblütiger Tiere, vorzugsweise aus Blut oder Serum von Kälbern, isoliertes Material handelt.

Ziel der Erfindung ist die Schaffung eines Verfahrens, das besonders auf die Gewinnung von Substanzen mit insulinähnlicher Wirksamkeit oder von Substanzen mit einem hohen Anteil an insulinähnlich wirksamen Verbindungen gerichtet ist. Diese insulinähnlichen Substanzen werden erfindungsgemäss aus Blut oder Blutbestandteilen gewonnen, die nicht vom Menschen kommen, sondern von warmblütigen Tieren stammen. Hierdurch ergeben sich sowohl Vorteile hinsichtlich der besonderen Wirkung als auch der Kosten. Die nach dem erfindungsgemässen Verfahren aus dem Blut warmblütiger Tiere, vorzugsweise aus einem oder mehreren Blutbestandteilen noch nicht geschlechtsreifer Kälber, isolierten Substanzen mit insulinähnlicher Wirksamkeit erzeugen weder beim Menschen noch

bei Tieren Insulinantikörper und sind in ihrer Wirkung auch durch solche Antikörper nicht hemmbar.

Während Blut oder Serum Substanzen mit insulinähnlicher Wirkung nur in einer Konzentration von 2,5 bis 8 $\mu\text{E}/\text{mg}$ Feststoff enthält, wurde nun gefunden, dass man durch eine bestimmte Behandlung von Blut oder Blutbestandteilen ein Produkt erhält, das über einen hohen Anteil an Substanzen mit insulinähnlicher Wirksamkeit verfügt, nämlich einen Anteil von etwa 14 bis 40 $\mu\text{E}/\text{mg}$ Feststoff.

Das erfindungsgemässe Verfahren der eingangs genannten Art ist dadurch gekennzeichnet, dass man das Blut oder die Blutbestandteile durch Einstellen des pH-Wertes auf 2 bis 4 oder auf 8 bis 10 vorbehandelt, das so vorbehandelte Blutmaterial über eine Zeitspanne von wenigstens vier Stunden auf 15 bis 40°C hält, das auf diese Weise inkubierte Blutmaterial auf eine Temperatur von weniger als 10°C abkühlt und aus dem behandelten Blutmaterial nach Neutralisation die so hergestellten organopeptidhaltigen Substanzen mit insulinähnlicher Wirksamkeit mit einem Molekulargewicht von 350 bis 5000 und einer insulinähnlichen Aktivität von 14 bis 40 $\mu\text{E}/\text{mg}$ Feststoff gewinnt.

Vor der Einstellung des pH-Wertes sollte man das Blut oder die Blutbestandteile mit 0,5 bis 4 Volumina eines hydrophilen Lösungsmittels verdünnen. Als Blut oder Blutbestandteile verwendet man normalerweise Gesamtblut, Plasma, Serum, Erythrocytensuspension und/oder Thrombocyten suspension. Als Blut oder Blutbestandteile lässt sich auch der nach Entfernen anorganischer oder organischer Substanzen mit einem Molekulargewicht von weniger als 5000 aus dem Blut oder den Blutbestandteilen erhaltene Rückstand verwenden. In ähnlicher Weise kann man als Blut oder Blutbestandteile auch den nach Entfernen anorganischer oder organischer Substanzen mit einem Molekulargewicht von weniger als 1000 aus dem Blut oder den Blutbestandteilen erhaltenen Rückstand einsetzen.

Dem erfindungsgemässen Verfahren liegen chemische bzw. chemischphysikalische Reaktionen zugrunde, die unter anderem eine Aktivierung der im Blut oder in Blutbestandteilen enthaltenen proteolytischen Fermente ergeben, so dass die gewünschten organopeptidhaltigen Substanzen gebildet werden können.

Die Gewinnung der Substanzen mit insulinähnlicher Wirksamkeit aus dem in der angegebenen Weise behandelten Blut oder den Blutbestandteilen erfolgt am besten durch Dialysieren gegen eine für ein Molekulargewicht von weniger als 5000 durchlässige Membran als Aussendialysat.

Die in obiger Weise gewonnenen Substanzen mit insulinähnlicher Wirksamkeit werden zweckmässigerweise einem Anreicherungsverfahren unterzogen, indem man aus den gewonnenen Substanzen mit insulinähnlicher Wirksamkeit anorganische Salze und niedermolekulare Substanzen entfernt und das Ganze auf ein Produkt mit insulinähnlicher Wirksamkeit mit einer insulinähnlichen Aktivität von etwa 35 μE bis etwa 200 $\mu\text{E}/\text{mg}$ Feststoff anreichert.

Es empfiehlt sich ferner die gewonnenen Substanzen insulinähnlicher Wirksamkeit oder das Produkt mit insulinähnlicher Wirksamkeit zur Bildung einer isotonischen Lösung einzuengen oder zu verdünnen, wobei man vorzugsweise auf einen Feststoffgehalt von 2,5 bis 20 mg/ml mit einer insulinähnlichen Aktivität von etwa 500 $\mu\text{E}/\text{ml}$ einstellt und die Isotonie gegebenenfalls durch Ergänzung mit Glucose oder Kochsalz herstellt.

Die in obiger Weise aus Blut oder Blutbestandteilen eines Warmblüters gewonnenen organopeptidhaltigen Substanzen mit insulinähnlicher Wirksamkeit haben ein Molekulargewicht von 350 bis 5000, eine durch Antikörper nicht hemmbare insulinähnliche Aktivität im Fettgewebstest von 35 bis 200 $\mu\text{E}/\text{mg}$, eine Löslichkeit in Alkohol, eine Hitzestabilität

bei neutralem pH, eine positive Ninhydrin- und Amidoschwarz-G-Reaktion, ein auf die Anwesenheit von Purinderivaten hinweisendes UV-Maximum bei 258 nm, einen durch eine Aminosäurebestimmung nach Hydrolyse ermittelten Peptidgehalt von 25 bis 30% des Trockengewichtes der salzfreien Substanzen mit folgenden Aminosäuren: Glutaminsäure, Leucin, Glycin, Serin, Asparaginsäure, Alanin, Isoleucin, Histidin, Valin, Threonin, Lysin, Methionin, Thyrosin, Prolin und Arginin, und eine sich am Einbau von Glucose in Fettzellen, an der Erniedrigung von erhöhtem Blutzucker bei Mensch und Tier, an der Hemmung der Lipolyse und an der Förderung des Wachstums von Zellkulturen, wie Fibroblasten, zeigende insulinähnliche Wirksamkeit.

Die insulinähnliche Wirksamkeit der nach dem erfindungsgemässen Verfahren gewonnenen Substanzen wird am epididymalen Fettanhang der Ratte in Anlehnung an die in J. Clin. Invest. 39, 1487-1498 (1960) beschriebene Methode bestimmt. Für jeden Fettgewebetest, der aus 24 Einzelbestimmungen besteht, werden drei männliche Ratten mit einem Gewicht von etwa 180 bis 200 g verwendet. Nach Präparation der beiden Fettkörper der Nebenhoden wird das Fettgewebe zerschnitten und so verteilt, dass man am Schluss in jedem der 24 Reaktionsgefässe je ein Teilstück von einem Vorder-, Mittel- und Hinterlappen aus einem Fettgewebeanhang hat (insgesamt 80 bis 100 mg Fettgewebe). Jede Bestimmung wird dreifach durchgeführt, wozu jeweils 35 mg der auf eine insulinähnliche Wirksamkeit hin zu untersuchenden Präparationen abgewogen und in 7 ml Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer, der 100 mg% Gelatine und 250 mg% Glucose enthält, gelöst werden. Die für die Untersuchungen verwendete Insulin-Eichkurve verfügt über einen Bereich von 63 bis 252 μ E Insulin. Die kompletten Ansätze enthalten etwa 100 mg Fettgewebe, 9,5 mg auf ihre insulinähnliche Wirksamkeit zu testende Substanz (oder auch Leerwerte oder verschiedene Insulinkonzentrationen), 1,9 Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer und 0,1 ml $1-^{14}$ C-Glucose. Sie werden 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

Anschliessend spritzt man in das Innengefäss des Reaktionskolbens zum Sammeln des 14 CO₂ eine Menge von 0,4 ml Hyamin und dann in das Inkubationsmedium unter Wahrung des geschlossenen Systems mit einer Kanüle 0,25 ml einer 2 n Schwefelsäure zur Freisetzung des 14 CO₂ ein. Nach 0,5 stündiger Inkubation der einzelnen Reaktionsgefässe bei einer Temperatur von 37°C wird das Hyamin aus den als Absorptionsgefässe dienenden Kunststoffkappen in dazu passende Kunststofffläschchen überführt, die als Zählgefässe dienen und mit 8 ml Toluol-Scintillationslösung gefüllt sind. Die verwendete Scintillationslösung besteht aus 4 g 2,5-Diphenyloxazol, 100 mg 1,4-Bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)benzol und einem Liter Toluol. Die Radioaktivität wird in einem Flüssigkeits-Scintillationsspektrometer gemessen.

Wird die gleiche Testanordnung unter Zusatz von Insulinantikörpern durchgeführt, kommt es zu keiner oder nur einer geringfügigen Abnahme der Messwerte.

Die Bestimmung einer Stimulation oder Hemmung der Lipolyse in Fettgewebe erfolgt unter Verwendung eines Fettgewebes, bei dem man mit 0,4 μ g Adrenalin/ml oder mit 0,1 μ g Glucagon/ml eine Lipolyse induziert. Anschliessend werden im Medium die Konzentrationsänderungen der freien Fettsäuren und des Glycerins vor und nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen der zu testenden insulinähnlichen Wirksubstanz bestimmt. Zum Vergleich wird eine Eichkurve erstellt mit Insulinlösungen verschiedener Konzentrationen zwischen 1 und 100 μ E/ml. Die angewandte Bestimmungsmethode ist im einzelnen in Arzheim. Forsch. 18, 1019 bis 1021 (1968) näher beschrieben.

Die Wirkung der erfindungsgemäss hergestellten Sub-

stanzen auf den Blutzuckerspiegel wird auch durch in-vivo-Versuche ermittelt. Hierzu verabreicht man 250 g schweren Wistarratten intravenös 3 g Glucose/kg. Eine Vergleichsgruppe erhält gleichzeitig mit der Glucosegabe 2 mg der nach Beispiel 4 hergestellten erfindungsgemässen Substanz (15 bis 20 μ E/mg). Die Blutzuckerspiegel steigen bei den Kontrolltieren innerhalb von 15 Minuten auf bis 400 mg% an und normalisieren sich nach 60 Minuten auf etwa 120 mg%. Bei den mit dem Wirkstoff behandelten Versuchstieren ergeben sich im gleichen Zeitraum um etwa 20% niedrigere Glucosenspiegel.

Die Injektion des gleichen Wirkstoffes bei Alloxan-diabetischen Ratten führt zu einem statistisch signifikanten Blutzuckerabfall im Vergleich zu Alloxandiabetischen Tieren, denen man anstelle des Wirkstoffes intravenös die gleiche Menge physiologische Kochsalzmenge injiziert.

Die in obigen biologischen Testen beschriebenen Eigenschaften zeigen, dass die erfindungsgemäss hergestellten Substanzen interessante Heilmittel sind. Sie eignen sich vor allem als blutzuckererniedrigende Mittel bei hyperglykämischen Warmblütern. Zu einer entsprechenden Behandlung werden die Substanzen zweckmässigerweise in Tagesdosen von etwa 200 bis 500 μ E/kg Körpergewicht eingesetzt, wobei man diese Wirkstoffmenge vorzugsweise in mehreren Teildosen zwei- bis dreimal täglich verabreicht. Die Verabfolgung des Wirkstoffes erfolgt vorzugsweise durch intravenöse Infusion, und die Substanzen werden daher am besten auch in die Form injizierbarer Lösungen gebracht.

Ein besonderer Vorteil der erfindungsgemäss hergestellten insulinähnlich wirkenden Substanzen ist darin zu sehen, dass sich mit ihnen auch die Spätfolgen einer nach langzeitiger Behandlung mit Insulin oder oralen Antidiabetika bei Diabetikern auftretenden Gewebsschäden behandeln lassen. Die erfindungsgemässen Wirkstoffe werden daher zweckmässigerweise am besten in Ergänzung zur üblichen Behandlung von Diabetikern verabfolgt. Diese besondere Wirkung der Substanzen wird zum einen Teil darauf zurückgeführt, dass in diesem Wirkstoff eine höhere Menge an insulinähnlichen Substanzen, die durch Insulinantikörper nicht hemmbar sind, vorhanden ist, und zum anderen Teil auch auf in diesem Wirkstoff vorhandene wachstumsfördernden Faktoren, die den Heilprozess begünstigen.

Aus der folgenden Tabelle geht der Einfluss des pH-Wertes auf die Herstellung von Substanzen mit insulinähnlicher Wirksamkeit hervor. Wie ersichtlich, ergibt sich bei den beiden beim erfindungsgemässen Verfahren gewählten pH-Bereichen von 2 bis 4 bzw. von 8 bis 10 gegenüber anderen pH-Werten eine besonders hohe Gesamtausbeute an Substanzen mit insulinähnlicher Wirksamkeit.

Tabelle

Einfluss des pH-Wertes auf die Gewinnung von Substanzen mit insulinähnlicher Wirksamkeit

Durchschnitts-pH-Werte und eingesetztes Ausgangsprodukt	Ausbeute in g Trockengew./100ml	Insulinähnliche Wirksamkeit μ E/mg	Gesamte insulinähnliche Wirksamkeit mE
Blut			
pH 7	1,2	11,0	13,2
pH 2,5-3,5	1,6	15,3	24,4
pH 9-10	1,3	18,6	24,1
Plasma			
pH 7	1,8	6,5	11,7
pH 2,5-3,5	2,7	14,7	39,7
pH 9-10	1,9	8,6	16,3

Tabelle (Fortsetzung)

Durchschnitts-pH-Werte und eingesetztes Ausgangsprodukt	Ausbeute in g Trockengew. 100ml	Insulinähnliche Wirksamkeit $\mu\text{E}/\text{mg}$	Gesamte insulinähnliche Wirksamkeit mE
Erythrozytensediment (1:1)			
pH 7	0,9	9,0	8,1
pH 2,5–3,5	2,8	5,3	14,8
pH 9–10	1,4	14,3	20,0
Vordialysiertes Blut			
pH 7	0,3	16,0	5,0
pH 3	3,0	>15,0	>30,0
pH 9,5	3,5	>30,0	>90,0

Beispiel 1

Drei Liter frisch entnommenes Blut von Schlachtkälbern werden mit 300 ml einer 3,8%igen Natriumcitratlösung und 20 g Phenol mechanisch vermischt und auf 4°C gekühlt. Nach Verdünnen mit 900 ml demineralisiertem Wasser wird der pH-Wert durch Zugabe von etwa 100 ml 6 n Salzsäure auf 3,5 eingestellt und der gesamte Ansatz unter Rühren 24 Stunden auf 35 bis 40°C erwärmt. Anschliessend wird wieder auf 4°C abgekühlt, worauf man das Ganze in Dialysierschläuchen (Kalle) mit einer Molekulargewichtsausschlussgrenze von etwa 5000 bis 6000 Dalton gegen destilliertes Wasser, das 0,2% Phenol enthält, dialysiert. Das Verhältnis von Innen- zu Aussendialysat beträgt etwa 1:5 bis 1:10. Die Dialyseschläuche werden zur Optimierung des Dialyseeffektes mechanisch bewegt. Nach 24 Stunden wird das Dialysat gewechselt, und nach weiteren 24 Stunden wird dieser Wechsel nochmals wiederholt. Das Innendialysat wird gegebenenfalls nach Beispiel 4 weiterverarbeitet. Die vereinigten Aussendialysate werden in einem Vakuumplattenumlaufverdampfer bei maximal 35°C auf 2 Liter eingeeengt und mit 2 n Ammoniaklösung auf pH 7,0 eingestellt. Anschliessend wird weiter auf 200 ml eingeeengt, ein eventuell entstandener Niederschlag abzentrifugiert und die klare Lösung gefriergetrocknet. Man erhält 48 g eines Substanzgemisches (Trockensubstanz) mit einer insulinähnlichen Aktivität von 15,3 $\mu\text{E}/\text{mg}$.

Beispiel 2

Das in Beispiel 1 beschriebene citrathaltige frische Kälberblut (3 Liter) wird in Zentrifugenflaschen zu 500 ml abgefüllt und bei 4°C in einer Christ-Zentrifuge, Modell 4 KS 30 Minuten bei 3400 U/Min. zentrifugiert. Aus 1 Liter Blut erhält man 0,6 bis 0,75 Liter überstehendes Plasma, das man abpipettiert und sammelt. Das Erythrozytensediment (0,30 bis 0,45 l) wird mit 0,5 prozentigem Phenolwasser im Verhältnis 1:1 verdünnt und für die weitere Verarbeitung ebenfalls gesammelt (siehe Beispiel 3). 1 Liter des Plasmateils wird mit 200 ml destilliertem Wasser, das 0,5% Phenol enthält, verdünnt und mit 6 n Salzsäure auf pH 3,0 eingestellt. Die weitere Wärmebehandlung, Dialyse, Konzentration und Lyophilisierung erfolgen analog Beispiel 1. Man erhält aus 1 Liter Plasma 27 g Trockensubstanz mit einer insulinähnlichen Aktivität von 14,7 $\mu\text{E}/\text{mg}$.

Beispiel 3

Die nach Beispiel 2 gewonnene Suspension des Erythrozytensediments aus 3 Liter Kälberblut wird unter Rühren mit 5 n Ammoniaklösung auf pH 9,0 eingestellt und zur Viskositätsniedrigung mit etwa 200 bis 300 ml Äthylalkohol versetzt. Die Erythrozyten hämolysieren. Nach dem Zentrifugieren erhält man eine klare Lösung. Anschliessend erfolgen Wärmebehandlung und Dreifachdialyse sowie Konzentration und Neutralisation der gesammelten Aussendialysate

mit Salzsäure und nachfolgende Lyophilisierung nach Beispiel 1. Aus einem Liter Erythrozytensuspension 1:1 erhält man 14 g Trockensubstanz mit einer insulinähnlichen Aktivität von 14,3 $\mu\text{E}/\text{mg}$.

Beispiel 4

Das in den Beispielen 1 bis 3 beschriebene Verfahren wird wiederholt, wobei man jedoch ein durch Dialyse von Blut oder Blutbestandteilen bei neutralem pH-Wert als Innendialysat erhaltenes Ausgangsprodukt verwendet. Hierzu werden 100 Liter eines neutralen Innendialysates (Blut, Plasma oder Erythrozytensuspension 1:1) mit 6 n Salzsäure unter Rühren auf pH 3,5 gebracht. Der so erhaltene Ansatz wird zur Viskositätsniedrigung dann mit 100 Liter 50 volumenprozentigem Alkohol versetzt, worauf man ihn unter 0,5 prozentigem Phenolschutz und Rühren 24 bis 48 Stunden bei 20 bis 30°C inkubiert. Nach Abkühlen auf 4°C werden die 200 Liter Gesamtlösung erneut gegen 0,2%iges Phenolwasser dialysiert. Es kommt zu einer starken Quellung des Innendialysates, die man durch Rühren in Grenzen hält. Das Volumenverhältnis von Innendialysat zu Aussendialysat liegt bei 1:2 bis 1:5. Nach jeweils 24 Stunden wird das Aussendialysat insgesamt viermal gewechselt und erneuert. Die dabei gesammelten Aussendialysate (etwa 2200 Liter vom pH 3,5) werden im Vakuum auf 25 Liter eingeeengt, mit 5 n Ammoniak neutralisiert, von Trübungen abfiltriert und auf 3,5 Liter weiterkonzentriert. Die Lösung lässt man dann eine Woche bei 4°C stehen, worauf man den gebildeten Niederschlag abfiltriert und die Restlösung nach Korrektur des pH-Wertes auf 6,9 bis 7,0 lyophilisiert. Aus 100 Liter Innendialysat (entsprechend etwa 85 Liter Blut) erhält man hierbei etwa 350 g Trockensubstanz mit einer insulinähnlichen Wirksamkeit von 15 bis 20 $\mu\text{E}/\text{mg}$.

Beispiel 5

Das in Beispiel 4 beschriebene Verfahren wird wiederholt, wobei man das als Ausgangsmaterial verwendete Innendialysat zur Gewinnung der insulinähnlich wirkenden Substanzen jedoch im alkalischen Bereich bei etwa pH 9,5 in gleicher Weise inkubiert und dialysiert. Die dabei erhaltenen Aussendialysate werden dann mit Salzsäure oder Essigsäure neutralisiert. Hierbei erhält man aus 100 Liter Blutinnendialysat etwa 350 g Trockensubstanz mit einer insulinähnlichen Wirksamkeit von 30 bis 40 $\mu\text{E}/\text{mg}$.

Beispiel 6

10 Liter frischentnommenes Kälber- oder Schweineblut werden mit 1000 ml 3,8%iger Natriumcitratlösung und 60 g Phenol mechanisch vermischt, auf 4°C gekühlt und mit 2 Liter demineralisiertem Wasser verdünnt. Die erhaltene Lösung wird zunächst mittels einer Zentrifuge geklärt und dann durch Ultrafiltrationsmembranen (z.B. PSAC-Pellicon-Membranen aus Acetylcellulose) mit einer Ausschlussgrenze von 1000 Dalton unter einem Druck von 6 at filtriert. Hierbei werden anorganische und organische Bestandteile mit einem Molekulargewicht unter etwa 800 bis 1200 Dalton eliminiert, und es bleibt ein dickflüssiger Brei zurück, den man in 2 Liter destilliertem Wasser aufnimmt. Die auf diese Weise erhaltene Suspension wird dann nach Beispiel 1, 2 oder 3 durch Ansäuern oder Alkalisstellen sowie Dialyse weiterbehandelt. Die so gewonnenen, gesammelten, neutralisierten, eingeeengten und lyophilisierten Aussendialysate enthalten 25 bis 30 g Trockensubstanz mit einer insulinähnlichen Aktivität von 20 bis 30 $\mu\text{E}/\text{mg}$.

Beispiel 7

4,5 g des nach Beispiel 4 erhaltenen Produktes mit 15 bis 20 $\mu\text{E}/\text{mg}$ werden in 25 ml destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung bringt man auf eine Säule (50×100), die mit einem

stark vernetzten Dextrangel mit einem Fraktionierungs-
bereich bis 700 Dalton (z.B. Sephadex G 10, Korngrösse 40 bis
120 µm) gefüllt ist. Die Säule wird dann mit 0,1 normaler
Essigsäure mit einer Geschwindigkeit von 60 ml/Stunde
eluiert. Es werden Fraktionen von je 12,4 ml entnommen, die
man in einem UV-Durchfluss-Photometer (z.B. Unicord III)
bei 206 und 254 nm misst, wobei man drei Hauptpeaks (Frak-
tionen Nr. 49 bis 79; 80 bis 119 und 120 bis 540) heraus-
schneidet. Die Hauptmenge der inaktiven Salze befindet sich
in Fraktion II. Die Fraktion I mit einer Ausbeute von 115 mg
enthält den salzfreien Hauptanteil der Substanz mit insulin-
ähnlicher Wirksamkeit mit 60 µE/mg. Die Fraktion III ent-
hält im wesentlichen niedermolekulare inaktive organische
Substanzen.

Die Molekulargewichtsbestimmung der Substanz aus
Fraktion I (115 mg) erfolgt an einer geeichten Gelfiltrations-
säule (26×100), die mit vernetztem Dextrangel (z.B.
Sephadex G 25, Korngrösse 50 bis 150 µm) gefüllt ist. Die
Elution mit 1 n Essigsäure (16 ml/Stunde) zeigt einen Haupt-
teil von etwa 99% mit einem Molekulargewicht unter 1000
Dalton, die Vorfraktion (15 mg, das sind 7,2% des gesamten
organischen Anteils der Fraktion) liegt im Bereich zwischen
350 und 5000 Dalton und zeigt die gesamte insulinähnliche
Wirksamkeit von 150 µE/mg.

Beispiel 8

In einer Apparatur zur trägerfreien Elektrophorese nach
Hanisch, die eine Fraktionierung in 90 Fraktionen gestattet,
werden innerhalb von fünf Stunden 3 g des nach Beispiel 1
erhaltenen Produktes mit 15,3 µE/mg in 15 ml Wasser gelöst
eingetragen. Die Lösung wird 1:1 mit Kammerpuffer ver-
dünnt, der aus einem 1:3 verdünnten Elektrodenpuffer
besteht. Der verwendete Elektrodenpuffer vom pH 4,9 ist
eine Mischung von 100 ml Pyridin und 80 ml Eisessig, die mit
Wasser auf 9000 ml aufgefüllt wird. Die Elektrophorese wird
bei einer Spannung von 1800 bis 1500 Volt und bei einer
Stromstärke von 150 bis 165 mA sowie bei einer Temperatur
von 5°C durchgeführt. Die Pufferpumpe fördert 10 ml/
Stunde, die Dosierpumpe 1,5 ml/Stunde und somit 0,75 ml

der aktiven Lösung. Es werden neun Fraktionen geschnitten,
wobei die Fraktion 6 (Röhrchen 41 bis 44), Fraktion 7
(Röhrchen 45 bis 48) und Fraktion 9 (Röhrchen 53 bis 55)
insulinähnliche Wirksamkeit aufweisen. Diese Fraktionen
werden lyophilisiert. Fraktion 6 besteht aus 16 mg mit einer
insulinähnlichen Wirksamkeit von 60 µE/mg, Fraktion 7
besteht aus 12,8 mg mit 150 µE/mg und Fraktion 9 besteht
aus 9,6 mg mit 190 µE/mg. Alle drei Fraktionen zeigen posi-
tive Ninhydrin- und Amidoschwarz-G-Reaktionen.

Beispiel 9

4 g des nach Beispiel 3 erhaltenen Produktes mit
14,3 µE/mg insulinähnlicher Wirksamkeit werden in 100 ml
destilliertem Wasser gelöst und auf eine mit einem Kationen-
austauscher auf Basis von Polystyrolmatrix (z.B. AG50 W -
X 8), der in der NH_4^+ -Form vorliegt und eine Korngrösse von
75 bis 150 µm hat, gefüllte Säule (26×40) aufgetragen. Nach
dem Einsickern der Probelösung wird die Säule so lange mit
destilliertem Wasser gewaschen, bis im Eluat UV-spektral-
photometrisch (Wellenlänge 254 nm) keine Substanz mehr
nachzuweisen ist (etwa 2 Liter). Dieses Eluat wird verworfen.
Die Säule wird nacheinander mit 200 ml 10%iger Ammoniak-
lösung und 3 Liter destilliertem Wasser eluiert. Die gesam-
elten Eluate werden in einem Vakuumrotationsverdampfer
auf ein Fünftel des ursprünglichen Volumens eingengt und
schliesslich gefriergetrocknet. Hierbei erhält man etwa
550 mg salzfreies Lyophilisat mit einer insulinähnlichen
Wirksamkeit von 32 µE/mg.

Eine Aminosäureanalyse der nach Beispiel 7 gewonnenen
Fraktion I zeigt vor und nach Hydrolyse (unter Stickstoff mit
6 n Chlorwasserstoffsäure bei einer Temperatur von 110°C
über eine Zeitdauer von 24 Stunden) folgende Werte in Pro-
zent: Ornithin und Lysin (12,23; 22,25), Histidin (1,30; 2,89),
Arginin (Spuren; 0,47), Asparaginsäure (0,71; 2,42),
Threonin (0,61; 1,13), Serin (0,39; 1,85), Glutaminsäure (0,20;
2,16), Prolin (1,38; 1,93), Glycin (0,15; 1,35), Alanin (1,54;
3,99), Cystein (0,06; 0,08), Valin (1,12; 2,41), Methionin
(0,17; 0,25), Isoleucin (0,14; 0,36), Leucin (0,16; 1,67),
Tyrosin (0,52; 1,15) und Phenylalanin (Spuren; 0,10).