ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA
(19)

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

199576
(11) (B2)

(51) Int. Cl.[3]
A 61 K 37/26
B 01 D 15/08

(22) Přihlášeno 10 02 75
(21) (PV 833-75)

(40) Zveřejněno **31 10 79**

(45) Vydáno 15 07 83

(72)
Autor vynálezu JACKSON RICHARD LEE dr., INDIANAPOLIS (Sp. st. a.)

(73)
Majitel patentu ELI LILLY AND COMPANY, INDIANAPOLIS (Sp. st. a.)

(54) Způsob čištění komplexu insulinu s alkalickými kovy nebo amonnými ionty

1

Vynález se týká způsobu čištění komplexu insulinu s alkalickými kovy nebo amonnými ionty.

Předmětem vynálezu je tedy způsob čištění komplexu insulinu s alkalickými kovy nebo s amonnými ionty, vyznačující se tím, že se nabobtná gel, který se vyznačuje v suchém stavu bobtnavosti 4 až 98 % hmot., jakož i průměrem částeček 20 až 80 mikronů, načež se naplní kolona nabobtnalým gelem, do kolony s náplní se přidá vodný roztok komplexu insulinu s alkalickým kovem s amonnými ionty o čistotě alespoň 80 procent, přičemž koncentrace insulinu je v rozmezí od 1 do 8 % hmotnost %/obj. % a celkové množství insulinu je dostačující k zajištění zatížení kolony v rozmezí od 0,8 do 6,7 g na litr objemu vrstvy a pH roztoku se pohybuje v rozmezí od 2,0 do 3,5, načež se eluce insulinu z kolony provádí za teploty v rozmezí od 5 do 30 °C za použití vodného elučního činidla s obsahem anorganické soli v koncentraci až 0,02 M a o hodnotě pH ve stejném rozmezí, jaké má roztok insulinu.

Na připojeném vyobrazení je eluční diagram pro příklad I. Nanáší se zde optická hustota při 280 mμ některých frakcí roztoku insulinu během průběhu filtrace na gelu.

Od objemu insulinu jako složky pankreasu v r. 1921 má tato látka celosvětovou důležitost při léčbě cukrovky (Diabetes mellitus). Protože se při postupech extrakcí insulinu z tkáně pankreasu extrahují rovněž podstatná množství neisulinových proteinů, bylo vynaloženo značné úsilí na zjištění postupů čištění insulinu, tedy způsobů oddělování insulinu od neinsulinových proteinů. Některé z takto nalezených postupů čištění insulinu mají provozně-obchodní důležitost.

2

Z těchto použitelných postupů je jeden z nejstarších založen na obecném jevu, že totiž se protein vyznačuje nejnižší rozpustností v isoelektrickém bodě za dalších konstantních podmínek. V US patentu 1 469 944 je popsán způsob čištění insulinu, vyznačující se tím, že se z vodného extraktu pankrease vysrážejí neinsulinové proteiny v odpovídajících isoelektrických bodech. Isoelektrické srážení insulinu z vodného extraktu pankreasu za hodnoty pH v rozmezí asi 4 až asi 7 je popsáno v US patentu číslo 1 520 673.

Při dalším z někdejších postupů se docílí srážení insulinu přidáním dostatečného množství anorganické soli. Tak je popsán v US patentu 1 547 515 prvý způsob vysolení insulinu z rozpouštědla, použitého při extrakci, a to přidáním chloridu sodného. Diferenciální způsob vysolování je popisován

v US patentu 2 448 076, záležejícím ve vysolení insulinu z neutralizovaného extraktu přidáním chloridu sodného s tím, že se pevný podíl odfiltruje, zbytek se znovu rozpustí a opět se vysolí insulin, tentokráte za nižší koncentrace soli, než jaká byla použita při prvém stupni vysolení.

Při třetí provozně důležité metodě čištění insulinu se používá vysrážení nebo krystalizace insulinu z roztoku ve formě komplexu insulinu se zinkem. Obecně se tento komplex vysráží z pufrovaného vodného roztoku, obsahujícího zinečnaté ionty. V US patentu 2 626 228 je popsáno například použití pufru z kyseliny citrónové a její soli z četných možných jiných pufrů.

V současné době využívají provozně-obchodní způsoby čištění insulinu všechny 3 výše uvedené způsoby, a protože komplex insulinu se zinkem je nejdůležitější obchodní formou insulinu, je obvykle posledním stupněm čištění insulinu stupeň krystalizace komplexu se zinkem.

Bylo však nalezeno v posledních letech, že neinsulinové proteiny, mezi nimiž převažuje proinsulin a jemu podobné proteiny, tvoří stále menší podíl obchodní formy insulinu, to jest komplexu se zinkem. Ačkoliv tyto složky obvykle představují méně než asi 8 hmotnostních % komplexu insulinu se zinkem; má se za to, že některé z těchto složek mají antigenní nebo imunogenní povahu.

V tomto směru viz na příklad Chance a spol., Science **161**, 165 (968); Steiner a spol., Diabetes **18**, 725 (1968); Bromer, BioScience **20**, 701 (1970) a Rubinstein a spol., Ann. Rev. Med. **22**, 1 (1971).

Stále trvajícím problémem je tedy odstranění neinsulinových proteinů z insulinu v provozním měřítku.

Výraz „insulin", jak se zde používá, zahrnuje nejen insulin jako takový, ale rovněž proteiny, podobné insulinu, jako je desamidoinsulin. Protože insulin a proteiny podobné insulinu mají rovněž podobné hypoglykemické vlastnosti, není obvykle třeba dělit insulin od ostatních pankreatických proteinů, to znamená, že obvykle není třeba připravovat homogenní insulin.

Jsou známé postupy dělení biologických látek na analytickém podkladu, jako je elektroforéza a iontoměničová chromatografie, a takto lze oddělovat neinsulinové složky od insulinové složky z obchodních a i surových insulinových preparátů. Těmito postupy je i možno dělit insulinové složky na insulin jako takový a deamidoinsuliny. Při velkoprovozních postupech však mají tyto způsoby problematickou použitelnost.

Postupem, který se dá snáze upravit pro použití ve velkoprovoze, je gelová filtrace (rovnocenným výrazem je gelová exklusní chromatografie nebo gelová permeační chromatografie). Při tomto postupu se dělí proteiny na koloně, obsahující gel, zesítěný takovým způsobem, že v každé částečce gelu se vytvoří póry. Ty se vyznačují definovaným, měřitelným objemem, který je přímo úměrný stupni bobtnání gelu a nepřímo úměrný stupni zesítění. Protože menší molekuly mají lepší přístup k těmto pórům než větší molekuly, je průchod menších molekul kolonou brzděn ve srovnání s většími molekulami, majícími jen částečný přístup k pórům, případně vůbec žádný přístup.

Gelová filtrace byla již v uplynulé době použita k čištění insulinu. Při izolování insulinu z pankreasů koček se získá surový insulin extrakcí okyselených alkoholem s následujícím vysrážením v alkalickém prostředí, čímž se odstraní inaktivní materiály, načež se po koncentrování provede isoelektrické vysrážení a posléze vysrážení vysolení chloridem sodným. Surový insulin se potom nanese na kolonu s gelem zesítěného dextranu, a eluování se provede 0,1 M roztokem kyseliny octové, viz Davoren, Biochem. Biophys. Acta **63**, 150 (1962).

Při izolování insulinu z ryb se žláza homogenizuje ve vodě a roztokem kyseliny trichloroctové se vysrážejí proteiny. Sraženina se extrahuje ethanolem okyseleným kyselinou, a z extraktu se methylenchloridem odstraní lipidní podíly. Zbývající pevné podíly se izolují, rozpustí v 5,0 M roztoku kyseliny octové, a roztok se filtruje kolonou s gelem ze zesítěného dextranu za použití 5,0 M roztoku kyseliny octové k eluování, viz Humbel, Biochem. Biophys. Res. Commun. **12**, 333 (1963). Jsou uváděny výtěžky okolo 80 %. Je třeba ještě uvést, že Humbel uvádí, že pro dobré oddělení insulinu od ostatních proteinů mají podmínky při eluování podporovat disociaci molekul insulinu. Dále uvádí, že 1,0 M roztok kyseliny octové není vyhovujícím rozpouštědlem, protože podle sdělení Yphantise a Waugha, Biochem. Biophys. Acta **26**, 218 (1957) nedochází tamže k dokonalé disociaci insulinu.

Surový extrakt z pankreasu hovězího dobytka se filtruje na gelu ze zesítěného dextranu podle Epsteina a spol., Biochemistry **2**, 461 (1963). K eluování se použije jako rozpouštědlo 0,2 M roztok hydrogenuhličitanu amonného, a toto činidlo podporuje rovněž Humbel (citace viz výše). Epstein se spolupracovníky se zmiňují o výtěžku asi 60 procent.

Insulin byl rovněž izolován z pankeasu lidí. Žláza se nejprve homogenizuje a extrahuje, dále se frakcionací síranem amonným odstraní inaktivní materiály, insulin se vysráží nejprve chloridem sodným, potom isoelektricky. Takto připravený insulin se rozpustí v 0,5 N roztoku kyseliny octové, a roztok se filtruje na gelu ze zesítěného dextranu. Filtrovaný roztok insulinu se potom převede na komplex insulinu se zinkem, viz Jackson a spol., Diabetes **18**, 206 (1969). Výtěžek insulinu po gelové filtraci činí asi 60 %.

Posléze se používá podle jihoafrického patentového spisu 69/5280 (odpovídajícího belgickému patentu 737 257) kombinace ge-

lové filtrace a iontoměničové chromatografie. Při jediném příkladu gelové filtrace (příklad 1) se komplex insulinu se zinkem filtruje kolonou s gelem zesítěného dextranu za výtěžku 80 %. K eluování se jako rozpouštědlo používá 1,0 M roztok kyseliny octové. Je třeba poznamenat, že podle právě uvedeného zdroje informací je třeba po filtraci provádět vysolení, isoelektrické srážení, jakož i postup krystalizace komplexu se zinkem má-li se získat komplex insulinu se zinkem.

Při každém z právě uvedených použití gelové filtrace pro čištění insulinu dochází k podstatným ztrátám insulinu. Dále pak není jasné z dřívěších postupů, že se lze spolehnout na to, že se při použití gelové filtrace získá pouze insulin, počítaje v to proteiny, podobné insulinu, jak o tom byla výše zmínka.

Obecně řečeno, může se použít při provádění postupu podle tohoto vynálezu jakýkoli gel, bobtnatelný vodou a použitelný při práci s roztoky proteinů. Takový gel se má vyznačovat za sucha, nebo v nabobtnalém stavu schopností přijímat vodu nejméně z 4 hmotnostních %, přepočteno na hmotnost suchého gelu, jakož i průměrem částeček pod asi 100 mikronů. S výhodou činí schopnost přijímat vodu od asi 4 do asi 98 %, nejvýhodněji je v rozmezí od asi 5 do asi 20 %. S výhodou činí rovněž průměr suchých částeček gelu pod asi 80 mikronů, a zvláště vhodným rozmezím průměrů částeček je rozsah od asi 20 do asi 80 mikronů.

Jako příklady vhodných gelů lze uvést kromě jiných: škroby, počítaje v to kukuřičný škrob, zesítěný galaktomannan, zesítěný dextran, agar nebo agarosu, polyakrylamidy, kopolymery akrylamidu a methylen-bis-akrylamidu, kopolymery methylen-bis-akrylamidu s vinylethylkarbinolem a s vinylpyrrolidonem a podobně. Za výhodné gely třeba pokládat zesítěné dextrany, jako je sefadexová série.

Typ kolony, použitý při postupu podle tohoto vynálezu, nemá rozhodující význam. Volba výšky kolony, průměru, nebo uspořádání je v závislosti na pracovních parametrech. Je jasné, že jak se výška kolony zvyšuje, průtoková rychlost se snižuje; jinak řečeno je zpětný tlak v koloně přímo úměrný výšce kolony. Z toho důvodu se pokládá za výhodné uspořádání patrová kolona. Pro použití obvyklé produkce dostačuje patrová kolona se šesti sekcemi.

Uspokojivé čištění insulinu lze provést za zatížení kolony asi 4,5 g komplexu insulinu a alkalického kovu nebo amonné soli na list objemu lože, což je nejvýhodnější zatížení. Avšak zatížení kolony může kolísat v rozmezí od 0,8 do 6,7 g na litr objemu lože, přičemž nejvýhodnějším rozmezím je 3,5 až 5,0 g na litr objemu lože. Pochopitelně se nejlepší podmínky snadno stanoví pro jakoukoli danou kolonu.

Gel lze bobtnat, jakož i kolonu lze plnit nabobtnalým gelem za použití kteréhokoli z četných postupů, které jsou odborníkům známé. Obecně se gel bobtná elučním prostředím; jinak se může gel bobtnat 30% vodným ethanolem, kdy se oddekantují jemné podíly, načež se nahradí bobtnací prostředí elučním prostředím.

Roztok soli insulinu s alkalickým kovem, nebo roztok amonné soli se může připravovat jakýmkoli vhodným způsobem. Například se může insulin rozpustit v odpovídajícím množství elučního prostředí, nebo se insulin může rozpustit ve vodném prostředí, jež je poněkud kyselejší, ale stále ještě v rozmezí hodnot pH elučního prostředí, ve srovnání s elučním prostředím. Například používá-li se jako eluční prostředí 0,5 M roztok kyseliny octové o hodnotě pH 2,5, může se insulin rozpustit ve vodném prostředí o hodnotě pH asi 2,3, což odpovídá 1,0 N roztoku kyseliny octové.

Roztok soli insulinu a alkalického kovu, nebo roztok amonné soli insulinu je obvykle alkalický svou povahou.

V důsledku toho po rozpuštění insulinu v neutrálním nebo kyselém vodném prostředí se pH získaného roztoku zvýší. Takže rozpustí-li se insulin v 1,0 N roztoku kyseliny octové, zvýší se pH získaného roztoku na asi 2,7. Avšak v závislosti na koncentraci použitého insulinu může mít roztok insulinu pH až asi 3,2. Toto zvýšení hodnoty pH je normální a nečiní problémy, to za předpokladu, že hodnota pH roztoku insulinu nepřestupuje asi 3,5. Jinak se může insulin rozpustit v 0,5 N roztoku kyseliny octové a pH se upraví na hodnotu pod asi 3,2 přídáním zředěné kyseliny chlorovodíkové.

Obecně se může sůl insulinu a alkalického kovu, nebo amonná sůl insulinu připravovat jakýkoli ze známých způsobů. Je však výhodné připravovat sůl insulinu a alkalického kovu nebo amonnou sůl insulinu postupem podle US patentu 3 719 655. Jak to zde již bylo uvedeno, musí mít řečený insulin čistotu nejméně asi 80 %. To znamená, že obsah insulinů, počítaje v to proteiny, podobné insulinu, vyznačující se hypoglykemickou aktivitou, musí činit nejméně asi 80 % z veškerých přítomných proteinů.

Koncentrace soli insulinu s alkalickým kovem, nebo amonné soli insulinu v roztoku insulinu, jak se nanáší na kolonu, činí — jak to zde již bylo uvedeno — od asi 1 do asi 8 % (hmotnost na objem). Výhodnou koncentrací je rozmezí 4 až asi 6 %.

Pro dosažení uspokojivých výsledků se má rozpustit sůl insulinu a alkalického kovu nebo amonné soli insulinu v objemu rozpouštědla, který je nižší než je dělicí objem, jak se o něm diskutuje zde dále.

Při chromatografování je distribuční koeficient K_d definován jako poměr koncentrace rozpuštěné složky v mobilní fázi ke koncentraci rozpuštěné složky ve stacionární fázi. Při gelové filtraci je mobilní fází roz-

pouštědlo, pohybující se ve volném prostoru mezi částečkami gelu, a stacionární fází je rozpouštědlo, vsáknuté do částeček gelu, tj. uzavřené do pórů uvnitř každé částečky gelu. Takže K_d značí onu frakci vsáknutého rozpouštědla, do které vznikla rozpuštěná složka.

Eluční objem V_e rozpuštěné složky lze za použití K_d vyjádřit rovnicí:

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

kde V_o je prázdný objem kolony a V_i je objem vsáknutého rozpouštědla. Pro K_d lze upravit rovnici na vztah

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

Pokládá-li se hustota vody za rovnou 1, $V_i = a \cdot W_r$, kde **a** je hmotnost suchého gelu a W_r je přírůstek vody. Takže pro K_d lze odvodit

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{aW_r}$$

a to může zručný odborník stanovit pokusně.

Za předpokladu roztoku o dvou rozpuštěných složkách lze vyjádřit eluční objem pro každou rozpuštěnou složku

$$V_s = V_e'' - V_e'$$

$$V_o'' = V_o + K_d'' V_i$$

Dělicí objem V_s je rozdíl mezi elučními objemy obou dvou rozpuštěných složek:

$$V_s = V_e'' - V_e'$$

$$V_s = (K_d'' - K_d')V_i$$

Z předchozího je jasné, že stupeň dělení dvou či více rozpuštěných složek je z části závislý na zatížení kolony. Jak se podíl rozpuště složky s nižší molekulovou hmotností blíží limitu dostupných pórů, musí nutně klesnout dělení obou rozpuštěných složek. V rozmezí možných zatížení, což tvoří část předmětu tohoto vynálezu, může stupeň dělení kolísat. V některých případech lze zvolit vyšší zatížení kolony k vyrovnání stupně dělení proti produktivitě.

Jak to zde již bylo výše uvedeno, může mít eluční prostředí pH v rozmezí mezi asi 2,0 do asi 3,5. Obecně řečeno, může se jako eluční prostředí použít vodný roztok jakékoli anorganické nebo organické kyseliny, jsou-li proteiny v takovém prostředí stálé. Jako příklady takových kyselin lze uvést mezi četnými jinými kyselinu chlorovodíkovou, fosforečnou, mravenčí, octovou, propionovou, n-máselnou, isomáselnou, pentanovou a podobně. Jako výhodnou kyselinu třeba jmenovat kyselinu octovou. Použije-li se kyselina chlorovodíková, musí se přidat do elučního prostředí konzervační činidlo, jako je fenol. A je třeba poznamenat, že kyselina octová je sama konzervačním činidlem. Výhodným rozmezím pH je hodnota asi 2,5. Proto nejvýhodnější eluční prostředí odpovídá 0,5 N roztoku kyseliny octové.

Je-li to žádoucí, může eluční prostředí obsahovat až asi do 0,02 molů anorganické soli na litr, a použitelnou solí je chlorid sodný, draselný, amonný a podobně. Za výhodnou koncentraci lze uvést koncentraci 0,01 M, a jako výhodnou sůl třeba označit chlorid sodný. Použití takové soli je výhodné; zlepší se tím dělení, a předejde se případné adsorpci bazických látek na gel.

Eluování kolony se dá provádět za teplot v rozmezí od asi 5 do asi 30 °C. S výhodou se pracuje za teploty místnosti nebo i nižší.

Průběh eluování se sleduje jakýmkoli vhodným způsobem, a jako zvláště použitelný postup lze uvést měření ultrafialové adsorpce při 280 nm každé frakce. Ty frakce, které obsahují očekávaný vyčištěný insulin, se spojí dohromady, a potom se převedou na komplex se zinkem.

Jak to zde již bylo výše uvedeno, je komplex insulinu se zinkem nejdůležitější formou insulinu. Proto se obvykle sůl insulinu s alkalickým kovem nebo amonná sůl insulinu ovysoké čistotě, jak se získá postupem podle tohoto vynálezu, převádí na komplex insulinu se zinkem. Probíhá to za pH 6,0 za přítomnosti octanu amonného jako pufru. Není třeba izolovat sůl insulinu a alkalického kovu nebo amonnou sůl insulinu z elučního prostředí, nebo koncentrovat roztok vyčištěného insulinu před krystalováním komplexu se zinkem. Výhodou postupu podle tohoto vynálezu je to, že insulin v roztoku, jak se izoluje, je po eluování dostatečně koncentrovaný, že není třeba používat vysrážení solí nebo isoelektrické vysrážení, ačkoliv se mohou tyto postupy použít, je-li to třeba.

V důsledku použití postupu podle tohoto vynálezu se získá komplex insulinu se zinkem o zvýšené čistotě. Lze to dokázat několika způsoby. Jednak je možno analyzovat komplex insulinu se zinkem s ohledem na obsah neinsulinových proteinových složek, jako je proinsulin nebo glukogon. Přítomnost proteinů o vysoké molekulové hmotnosti, kam patří jako typický příklad protaminasa, tedy proteolytický enzym, se dá stanovit sledováním stálosti protamin-insulinové suspeze za zvýšených teplot; za přítomnosti protaminasy dojde k disociaci komplexu protaminu s insulinem v důsledku degradace protaminu. Fyzikální vlastnosti, jako je rozpustnost komplexu insulinu se zinkem za neutrálního pH, jakož i barva vzniklého roztoku se dají měřit. Posléze lze sledovat biologickými a imunologickými testy specifickou aktivitu insulinu.

V důsledku vyšší čistoty je komplex insulinu se zinkem, jak se získá po provedení postupu podle tohoto vynálezu, žádoucím materiálem k použití do různých farmaceutických forem insulinu, jako je třeba insulin jako takový, isofan-insulin, protaminový komplex insulinu se zinkem, suspenze komplexu insulinu se zinkem, globininsulin a podobně. Dále pak čistší komplex insulinu se zinkem dovoluje přípravu neutrálního insulinu, který je stálejší než kyselý insulin; nečistoty, které byly až dosud přítomny v komplexu insulinu se zinkem, se vysrážejí částečně za neutrálního pH. Tyto nečistoty často obsahují enzymy, odbourávají insulin, jako je trypsin a chymotrypsin, snižující účinnost insulinových přípravků. Čistší komplex insulinu se zinkem dovoluje rovněž přípravu protrahovaných přípravků s obsahem insulinu z prasat a hovězího dobytka, a to bez dalších případných čištění, jak to bylo třeba v minulých létech. Konečně příprava isofan-insulinu z čistšího komplexu insulinu se zinkem vyžaduje menší podíl protaminu, protože nepřítomnost nečistot povahy kyselých proteinů dovoluje použití pouze takovému množství protaminů, jež je nutné k vysrážení insulinu.

Postup se dá kombinovat, jak je to vhodné, s dalšími postupy čištění. Například se může roztok komplexu insulinu s alkalickým kovem nebo roztok amonné soli insulinu filtrovat jednou či vícekrát před prováděním vlastní gelové filtrace. Rovněž je možno filtrovat jednou či vícekrát eluovaný insulin před vlastní konverzí na komplex insulinu se zinkem.

Příklad 1

Gel ze zesítěného dextranu s přírůstkem vody 5 % a s velikostí částeček od 20 až do 80 μ se uvede do rovnovážného stavu v prostředí 0,5 N roztoku kyseliny octové. Laboratorní kolona K100/100 o průměru průřezu 10 cm a o délce 100 cm se naplní nabobtnalým gelem na objem lože 7 litrů (hloubka lože 89 cm). Dále se rozpustí 17,5 g sodné soli insulinu z hovězího pankreasu, připravené postupem podle US patentu 3 719 655 a s účinností 23,8 jednotek/mg, a s obsahem proinsulinu 4,21 % hmotnostních v 400 ml 0,5 N roztoku kyseliny octové. Roztok insulinu se nanese na kolonu s následujícím eluováním za použití 0,5 N roztoku kyseliny octové za tlaku 0,035 kPa, čímž se docílí průtoková rychlost 900 ml za hodinu (lineární průtoková rychlost 0,19 ml/cm^2/min).

Za následující eluování prázdného prostoru (1725 ml) se jímají frakce o asi 23,5 ml a obsah proteinů se stanoví měřením ultrafialové absorpce při 280 nm. Stanoví se rovněž koncentrace pevných podílů v mg/ml, a jímá se celkový počet 240 frakcí. Tyto frakce se spojí do 4 skupin, jak je to uvedeno v souhrnu dále

Skupina	Objem ml	Frakce	Procento pevných podílů[a)]	Identifikace
A	1405	10—69	1,4	Vysokomolekulární proteiny a enzymy
B-1	1193	70—119	2,4	hlavně proinsulin
B-2	978	120—160	9,7	proinsulin a insulinové meziprodukty
C	1520	161—225	86,4	insulin

a) procento celkových pevných eluovaných podílů

Do skupiny C se přidá 3,0 ml 20% roztoku chloridu zinečnatého, a vzniklý roztok se zředí na objem 3025 ml přidáním 0,5 N roztoku amoniaku. Hodnota pH konečného roztoku se upraví na 6,0 přidáním zředěného roztoku amoniaku, načež se vysrážený komplex insulinu se zinkem isoluje odstředěním, a promyje se postupně vodou, absolutním alkoholem, a etherem, načež se vysuší ve vakuu. Výtěžek komplexu insulinu se zinkem činí 13,9 g; účinnost insulinu byla 25,6 jednotek/mg, obsah proinsulinu činí 0,44 %.

Protože obsah pevných látek skupiny C činí 86,4 % z veškerých eluovaných pevných podílů, činí maximum výtěžku pevných podílů ze skupiny C 86,4 % z 17,5 g, nebo 15,1 g; na podkladě jednotek činí nejvyšší možný výtěžek asi 360 000 jednotek. Takže výtěžek komplexu insulinu se zinkem ze skupiny C odpovídá 91,9% výtěžku, přepočteno na hmotnostní podklad, a 98,9%, přepočteno na jednotky. Za přepočtu na výchozí materiál činí hmotnostní výtěžek a výtěžek jednotek 79,4 % a 85,4 % v tom kterém případě.

Skupina B-2 se vysráží nadbytkem iontů zinku, jak je to popsáno výše pro skupinu C, načež se sraženina rozpustí v 0,5 N roztoku kyseliny octové, a roztok se refiltruje na menší koloně. Insulin se překrystaluje, jak je to popsáno výše pro skupinu C, čímž se získá další podíl 1,0 g komplexu insulinu se zinkem s účinností 26,7 jednotek na mg. Takže celkový výtěžek komplexu insulinu se zinkem, přepočteno na výchozí materiál, činí 85,1 % na hmotnostním podkladu a 91,8 % na podkladu jednotek.

K lepšímu porozumnění postupu, popsaného v příkladu 1, se nyní odkazuje na při-

pojený výkres. Jedná se o eluční diagram pro příklad 1, tj. nanášení optické hustoty při 280 nm různých frakcí proti počtu frakcí. Takže v diagramu se jeví obsah proteinu jímaných frakcí proti průběhu ředění. Jímání frakcí do několika skupin, jak je to popsáno v příkladu 1, je zachyceno trhavými svislými čárami. Z diagramu je jasné, že výchozím materiálem je v podstatě insulin a že insulinová složka se tím účinně oddělí od proinsulinu a podobných proteinů.

Příklad 2

Opakuje se postup podle příkladu 1 s tou výjimkou, že se sodná sůl insulinu 2 hovězího dobytka nahradí 30 g sodné soli insulinu z prasat, a množství 0,5 N roztoku kyseliny octové, ve které se rozpustí insulin, se zvýší na 600 ml. Sodná sůl insulinu z prasat, jež má účinnost 23,3 jednotek na mg a obsah proinsulinu hmotnostně 2,42 %. Byly tím dosaženy tyto výsledky:

Skupina	objem, ml	Frakce	% pevných podílů[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)] procento veškerých eluovaných pevných podílů

Ze skupiny C se získá 26,5 g komplexu insulinu se zinkem o účinnosti 25,3 jednotek na mg a s obsahem proinsulinu 0,57 %. Takže výtěžek komplexu insulinu se zinkem odpovídá výtěžku 98,1 % na hmotnostním podkladě nebo 95,9 % na podkladě jednotek.

Komplex insulinu se zinkem, připravený z téže dávky pankreasu za použití postupu, kdy se krystalizace v alkalickém prostředí a postup gelové filtrace nahradí obvyklým isoelektrickým srážením s vodného a vodně-alkoholického prostředí, se získá ve stejném výtěžku po přepočtu na stejnou hmotnost pankreasu. Avšak účinnost činí pouze 24,3 jednotek na mg, a obsah proinsulinu činí 3,18 %.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob čištění komplexu insulinu s alkalickými kovy s amonnými ionty, vyznačující se tím, že se nabobtná gel, který se vyznačuje v suchém stavu bobtnavostí 4 až 98 % hmot., jakož i průměrem částeček 20 až 80 mikronů, načež se naplní kolona nabobtnalým gelem, do kolony s náplní se přidá vodný roztok komplexu insulinu s alkalickým kovem s amonnými ionty o čistotě alespoň 80%, přičemž koncentrace insulinu je v rozmezí od 1 do 8 % (hmot.%/obj.%) a celkové množství insulinu je dostačující k zajištění zatížení kolony v rozmezí od 0,8 do 6,7 g na litr objemu vrstvy a pH roztoku se pohybuje v rozmezí od 2,0 do 3,5, načež se eluce insulinu z kolony provádí za teploty v rozmezí od 5 do 30 °C za použití vodného elučního činidla s obsahem anorganické soli v koncentraci až 0,02 M a o hodnotě pH ve stejném rozmezí, jaké má roztok insulinu.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se používá gel, schopný přijímat vodu v rozmezí od 5 do 20 %.

3. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že se jako gel používá zesítěný dextran.

4. Způsob podle bodu 3, vyznačující se tím, že se používá gel se schopností přijímat vodu v množství 5 %.

5. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se pracuje za zatížení kolony v rozmezí od 3,5 do 5,0 g na litr objemu vrstvy.

6. Způsob podle bodu 5, vyznačující se tím, že se pracuje za zatížení kolony 4,5 g na litr objemu vrstvy.

7. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se insulin rozpustí v 1,0 N roztoku kyseliny octové.

8. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se insulin rozpustí v roztoku 0,5 N kyseliny octové a hodnoty pH se upraví přidáním zředěné kyseliny chlorovodíkové.

9. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako eluční činidlo použije 0,5 N roztok kyseliny octové.

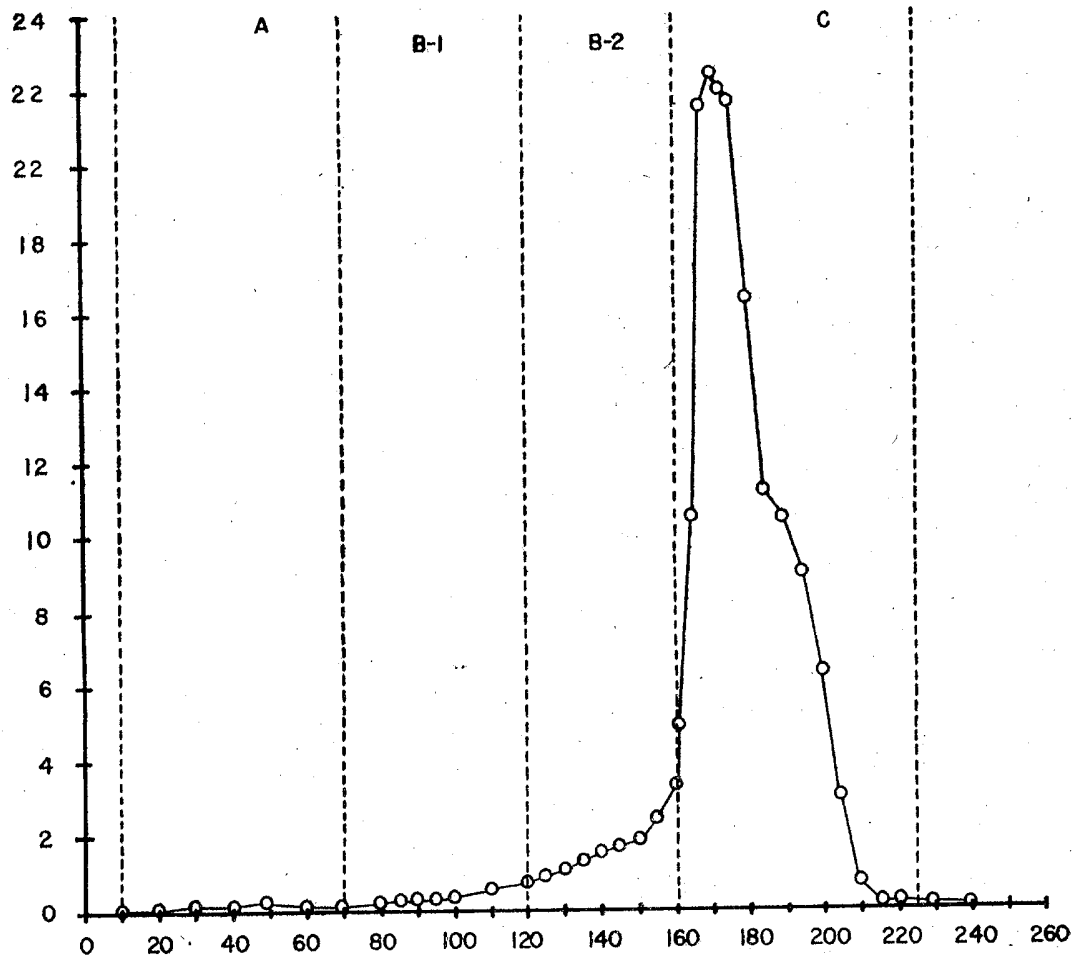
10. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se použije anorganická sůl v koncentraci 0,01 M.

11. Způsob podle bodu 10, vyznačující se tím, že se jako anorganická sůl používá chlorid sodný.

12. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se eluce provádí za teploty místnosti.

1 list výkresů

Severografia, n. p., závod 7, Most


A
B-1
B-2
C
24
22
22
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
240
260