



SUOMI—FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

[B] (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLÄGGNINGSSKRIFT 64508

C Patentti myönnetty 12 12 1983
(45) Patent meddelat

(51) Kv.kk.³/Int.Cl.³ A 61 K 37/26, C 07 C 103/52

(21) Patentihakemus — Patentansöknin	770112
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	14.01.77
(23) Aikupäivä — Giltighetsdag	14.01.77
(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig	17.07.77
(44) Nähtäväksi panon ja kuuljulkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utskriften publicerad	31.08.83
(32)(33)(31) Pyydetty etuolkeus — Begärd prioritet	16.01.76
Iso-Britannia-Storbritannien(GB)	1740/76

- (71) Laboratorios Leo S.A., Avda. de Pio XII No. 99, Madrid, Espanja-Spanien(ES)
(72) Willy Henry Jensen, Madrid, Gregorio Ramon Cebrian, Madrid, Jose' Adrian Aguas, Madrid, Espanja-Spanien (ES)
(74) Oy Kolster Ab
(54) Menetelmä puhtaan insuliinin, kuten sian insuliinin, valmistamiseksi haimarauhasista - Förfarande för framställning av rent insulin, såsom insulin av svin, ur bukspottkörtlar

Keksinnön kohteena on menetelmä insuliinin, kuten sian insuliinin, valmistamiseksi, joka on puhdistettu niin pitkälle, että vain yksi ainoa komponentti on todettavissa, kun se analysoidaan polyakryyliamidigeelielektroforeettisesti käyttäen 15 % polyakryyliamidia sisältävää geeliä, jossa menetelmässä haimarauhasista valmistetaan insuliiniuute, joka käsitellään edelleen puhtaaksi insuliiniksi. Keksinnön mukaisella menetelmällä valmistettu insuliini ei muodosta insuliinia tuhoavia vasta-aineita.

Nykyään oletetaan yleisesti, että insuliinivalmisteiden taipumus muodostaa vasta-aineita johtuu suurimmaksi osaksi valmisteiden epäpuhtauksista. Aikaisemmin oli uskottu, että itse insuliini aiheutti itselleen spesifisiä vasta-aineita. Nämä epäpuhtaudet voivat olla haimasta peräisin olevia, insuliinille vieraita oheisproteiineja, insuliinin esiastetta proinsuliinia, insuliinin väliasteita, dimeerejä, arginiini-insuliinia, etyyliesteri-insuliinia, desamidoin-suliinia, jonka deamidoitumisaste on erilainen, ja muita insuliinimuun-

noksia.

Siten pyritään valmistamaan insuliinivalmisteita, jotka sisältävät ainoastaan puhdasta insuliinia, ns. yksikomponentti-insuliinia ilman epäpuhtauksia ja oheisaineita, ks. esim. englantilaiset patenttijulkaisut 1 285 023 ja 1 285 024.

Tämä voidaan toteuttaa suorittamalla tavalliseen tapaan valmistetulle amorfiselle tai kiteiselle insuliinille perusteellinen lisäpuhdistus esim. geelisuodatus- ja/tai ioninvaihtomenetelmällä.

Muodostuneiden, perusteellisesti puhdistettujen insuliinien taipumus muodostaa vasta-aineita on vähentynyt huomattavasti, mutta ei kokonaan hävinnyt. Syynä on epäilemättä se, että puhdistusvaiheista huolimatta puhdistetuissa tuotteissa on edelleen epäpuhtauksia.

On havaittu, että osa insuliinin epäpuhtauksista syntyy insuliinin eristämisvaiheessa, jolloin insuliini voi esimerkiksi hajota tai voi muodostua aggregaatteja. Haimarauhasissa, joista insuliini eristetään, se on puhtaana monomeerinä (molekyyllipaino n. 6000), ja haimarauhasista monomeeri uutetaan sellaisenaan tavalliseen tapaan happamalla 60 - 80-prosenttisella alkoholivesiliuoksella. Tavanomaisessa jatkokäsittelyssä, johon kuuluu mm. rasvan erotus uutteesta vaakuutislauksella 25 - 30°C:ssa, jolloin alkoholi haihtuu ja saadaan hyvin vähän alkoholia sisältävä vesiuute, monomeeri voi kuitenkin helposti hajota entsyymien vaikutuksesta, jotka toimivat tehokkaasti vesiliuoksessa (liuosten alkoholipitoisuus alle 50 %) mutta ovat tehotomia alkoholiliuoksessa (liuosten alkoholipitoisuus yli 50 %); voi myös tapahtua aggregaattimuodostusta jne.

Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista, että insuliini uutetaan sellaisella uuttoaaineella, jossa ei tapahdu insuliinin entsyymaattista hajoamista eikä aggregaattien muodostusta, kuten veden ja orgaanisen liuottimen, edullisesti alkoholin tai asetonin, seoksella, joka uuttoaaine sisältää vähintään 50 tilavuus-% orgaanista liuotinta, jolloin osa uuttoaaineen sisältämästä vedestä on peräisin haimarauhasista, ja pidetään koko käsittelyprosessin ajan lopputuotteen eristämiseen saakka liuotettuna mainittuun liuottimeen tai perättäin useisiin erilaisiin saman tyyppisiin liuottimiin liuotettuna, jolloin uuttoa seuraava käsittelyprosessi käsittää seuraavat päävaiheet:

rasvan poisto insuliinista, edullisesti jäädyttämällä uute voimakkaasti, esimerkiksi lämpötilaan alle -25°C, ja erottamalla sen jälkeen muodostuneet rasvakiteet,

rasvattoman insuliinin väkevöinti, edullisesti käänteisosmoosin avulla,

väkevöidyn liuoksen edelleen puhdistaminen, edullisesti käsittelemällä ioninvaihtajalla,

kunnes tuloksena on puhdas insuliini liuotettuna epäpuhtauksista vapaaseen liuottimeen, jonka jälkeen mahdollisesti saostetaan insuliini.

Edellä mainituissa brittiläisissä patenttijulkaisuissa 1 285 023 ja 1 285 024 selitetään menetelmä hyvin puhtaan insuliinin valmistamiseksi lähtien tavanomaisella menetelmällä valmistetusta amorfisesta tai kiteisestä insuliinista. On mainittu, että puhdistettu insuliini on, polyakryyliamidigeelielektroforeettisen analyysin mukaan, oleellisesti yksikomponenttinen. Tämä insuliini kuitenkin aina sisältää pienen määrän monodesamidoinsuliinia, ja mikäli suoritetaan polyakryyliamidigeelielektroforeesi käyttäen 15 % polyakryyliamidia sisältävää geeliä, saadaan näkyviin kaksi nauhaa, nimittäin monoinsuliininauha, ja sen lisäksi monodesamidoinsuliininauha.

Pieniä monodesamidoinsuliinipitoisuuksia ei voida todeta polyakryyliamidigeelielektroforeesin avulla käytettäessä 7,5 % polyakryyliamidia sisältävää geeliä. Tällaisella geelillä ei saavuteta eri komponenttien täydellistä erottumista, vaan insuliini ja monodesamidoinsuliini kulkevat yhtenä nauhana.

Desamidoinsuliineja muodostuu tovanomaisissa puhdistus- ja väkevöintivaiheissa, esimerkiksi haihdutettaessa tyhjiössä, jolloin insuliini haihdutuksen loppuvaiheessa on liuenneena veteen lämpötilan ollessa korkeahko. Kun desamidoinsuliinia on kerran muodostunut, on hyvin vaikea erottaa se insuliinista, ja se tulee esiintymään epäpuhtautena myös amorfisessa ja kiteisessäkin insuliinissa, joista aineista lähdetään mainittujen englantilaisten patenttijulkaisujen mukaisissa menetelmissä. Tämä epäpuhtaus jää mainittujen patenttijulkaisujen mukaisilla menetelmillä puhdistettuihin lopputuotteisiin.

Myös suomalaisen patenttihakemuksen 760058 mukaisessa menetelmässä lähdetään kiteisestä insuliinista, ja tällöinkin saadaan monodesamidoinsuliinia sisältävä lopputuote.

Insuliini liukenee hyvin helposti esimerkiksi n. 55 - n. 80 tilavuus-% alkoholia sisältävään happameen alkoholiiuutteeeseen, ja oikein käsiteltynä tällaisessa uutteessa oleva insuliini ei muodosta aggregaatteja itsensä eikä alkoholiiuutteen epäpuhtauksien kanssa.

Voidaan tietenkin käyttää muitakin uuttonesteitä kuin hapanta alkoholivesiliuosta, joihin insuliini liukenee helposti ja joissa se

ei muodosta aggregaatteja itsensä tai uutteen epäpuhtauksien kanssa, esim. asetonivesiliuosta.

Käsiteltävässä suoritustavassa ei ole kyse itse insuliinin puhdistamisesta, vaan saatu insuliiniuute puhdistetaan uutossa liuoksesta epäpuhtauksista ja rasvasta, kunnes uutteisissa on vain puhdasta insuliinia.

Menetelmä voidaan toteuttaa esim. seuraavasti:

Hienojakoisia, jäätyneitä haimarauhasia uutetaan 60 - 80 tilavuus-%:isella etyylialkoholilla, jonka pH on säädetty esim. suolahapolla arvoon n. 3. Haimamassan erottamisen jälkeen uutteen pH säädetään arvoon n. 8, jolloin saostuu erilaisia proteiineja, jotka poistetaan. Sitten pH säädetään arvoon n. 3. Edellä mainitun saostuksen asemasta proteiinit voidaan erottaa johtamalla uutteen (pH 2 - 3) ultra- ja hypersuodatuslaitteen läpi (selostettu myöhemmin) käyttäen sopivaa kalvoa, joka pidättää mainitut proteiinit, mm. entsyymejä.

Muodostunut kirkas uute jäähdytetään erityisessä rasvanjäähdytyslaitteessa lämpötilaan n. -30° ... -45°C , edullisesti n. -35°C :seen, jolloin rasva kiteytyy tiiviinä, pienipintaisina rasvakiteinä. Nämä erotetaan samassa matalassa lämpötilassa esim. linkoamalla. Tässä matalassa -30° ... -45°C :n lämpötilassa ja alkoholipitoisuuden pysyessä 60 - 80 tilavuus-%:na insuliini ei vaurioidu, mikä tapahtuu tavallisessa rasvanpoistossa vakuumitistaamalla 25° ... 30°C :ssa uutteen alkoholipitoisuuden laskiessa.

Rasvan liuotus alhaisessa lämpötilassa on selostettu yksityiskohtaisemmin saksalaisessa hakemusjulkaisussa DE 2 531 804.

Kun rasva on poistettu insuliinia vahingoittamattomalla tavalla, saadaan suhteellisen suuri määrä uutetta, joka on väkevöitävä samoin insuliinia vaurioittamattomalla tavalla.

Voidaan käyttää geelisuodatusta ja/tai ioninvaihtoa, mutta keksinnön mukaisesti suositellaan seuraavaa tapaa:

Käytetään ultra- ja hypersuodatuslaitetta, joka toimii kalvo-menetelmän eli ns. käänteisosmoosin mukaan (vrt. esim. yhdysvaltalaiseen patenttiin 3 623 610).

Tätä menetelmää käytettäessä voidaan sopivia membraaneja käyttämällä nestetilavuuden konsentroinnin lisäksi erottaa insuliini uutteen epäpuhtauksista ja oheisaineista sekä aineista, joilla on suurempi tai pienempi molekyylipaino kuin insuliinilla. Ei vain poisteta

haimasta peräisin olevia, uutteeseen liuenneita ja ei-toivottuja epäpuhtauksia, vaan myös kaikki muut mahdolliset, haiman ulkopuolelta peräisin olevat, insuliinin koosta poikkeavat molekyylit, jotka teurastamoissa erehdyksessä tai varomattomuudesta ovat joutuneet haimoihin mukaan.

Yksikomponentti-insuliinin valmistamiseksi on ratkaisevaa, että suurin osa näistä insuliinia suuremmista tai pienemmistä molekyyleistä saadaan erotetuksi tässä vaiheessa, koska tällöin epäpuhtaudet ovat liuenneina eivätkä ne ole pystyneet vaurioittamaan liuennutta insuliinia johtuen mm. edellisten menetelmävaiheiden alhaisesta lämpötilasta.

Rasvaton, kirkas uute pumpataan ultrasuodatuslaitteen läpi, jossa uutteita voidaan jäähdyttää riittävästi, esim. lämpötilaan n. $+10^{\circ}$ - -10°C , edullisesti 0° - -10°C , paineessa 2 - 20 ilmakehää, edullisesti 6 ilmakehää. Tällöin valitaan sellainen kalvotyyppi, esim. GRX-6 tai GRX-7 (polysulfonikalvoja, valmistaja De Danske Sukkerfabrikker A/S), että insuliinia suuremmat ei-toivotut molekyylit saadaan erotetuksi mahdollisimman tarkasti. Suuret molekyylit jäävät konsentraattiin, ja insuliini ja molekyylikooltaan insuliinia pienemmät epäpuhtaudet joutuvat permeaattiin. Sitten tämä liuos johdetaan hypersuodatuslaitteen läpi, jonka kalvotyyppi, esim. GR8-9 tai 930 (selluloosa-asetatti, valmistaja De Danske Sukkerfabrikker A/S, on valittu siten, että suurin osa insuliinia pienemmistä ei-toivotuista molekyyleistä saadaan erotetuksi mahdollisimman tarkasti. Insuliini jää konsentraattiin. Lähtöuutetta voidaan väkevöidä halutulla tavalla, esim. 1/5 - 1/40-osaan alkuperäistilavuudesta. Alkoholin ja veden pitoisuussuhde pysyy samana kuin lähtöuutteessa.

Ultra- ja hypersuodatuslaitteessa käytettävien kalvojen on kes-tettävä konsentroituja, esim. 62-%:isia alkoholiliuoksia. Yllä mainittujen polysulfoni- ja selluloosa-asetattikalvojen lisäksi voidaan käyttää muista polymeereistä, esim. määrättyistä polyamideista valmistettuja kalvoja.

Ultra- ja hypersuodatuslaitteiden suhteen voidaan viitata esim. seuraaviin patenttijulkaisuihin: yhdysvaltalainen patentti 3 872 015, englantilainen patentti 1 390 671 ja sveitsiläinen patentti 542 639, joissa on kuvattu laitteen rakennetta ja/tai sen osia.

Saatu konsentraatti, joka sisältää lähes kaiken raakauutteen insuliinin, on läpinäkyvää, mutta sen väri on konsentroinnista joh-

tuen voimakkaampi kuin alkuperäisuuhteella. Väriaineet poistetaan pesemällä esim. 62 %:isella alkoholilla käyttämällä kalvoja, jotka pidättävät insuliinin, mutta päästävät väriaineet läpi. Pesuneste ja väriaineet joutuvat kokonaisuudessaan permeaattiin konsentraatin tilavuuden pysyessä muuttumattomana.

Väriaineiden lisäksi saadaan uutteesta samalla poistetuksi suolat, jotka ovat tulleet mukaan haimarauhasia uutettaessa.

Insuliinipitoisessa uutteessa vielä jäljellä olevat melko harvat epäpuhtaudet voidaan sopivimmin poistaa ioninvaihtajilla, sekä kationin- että anioninvaihtajilla. Erottaminen voi myös tapahtua molekyyliseulalla, esim. Sephadex[®] G-50, valmistaja Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Ruotsi, tai muiden tunnettujen erotusmenetelmien avulla, mutta ioninvaihtajien käyttö on suositeltavaa.

Ioninvaihtomenetelmät insuliinin puhdistamiseksi sekä pylväsmenetelmän että panosmenetelmän mukaan ovat tunnettuja, ja varsinkin pylväsmenetelmä tunnetaan melko hyvin.

Kuitenkaan näitä menetelmiä ei ole käytetty puhdistettaessa epäpuhtaan insuliinin konsentroitua, rasvatonta alkoholiuutetta. Epäpuhtaan insuliinin tavanomaisista liuennutta rasvaa sisältävistä alkoholiuutteista sitoutuu varsinkin pylväsmenetelmässä ioninvaihtajiin siinä määrin epäpuhtauksia, väriaineita ja rasvaa, että ioninvaihtajat yhden tai kahden adsorption ja eluoinnin jälkeen ovat niin epäpuhtaita, että niiden puhdistaminen ja regenerointi insuliinin erottamista varten on erittäin hankalaa.

Ioninvaihto- ja molekyyliseulamenetelmien edellytyksenä on, että käsiteltävä uute on puhdistettu rasvasta, osaksi myös väriaineista, vieraista proteiineista ja muista epäpuhtauksista siinä määrin, että ioninvaihtajat ja molekyyliseulat voidaan regeneroida ja puhdistaa pitkäaikaista käyttöä varten. Muussa tapauksessa niiden käyttö on kannattamatonta.

Tällainen riittävä ja välttämätön epäpuhtaan insuliinin alkoholiuutteen esipuhdistus voidaan toteuttaa juuri yllä kuvatun menetelmän avulla. Tällöin rasva poistetaan kiteyttämällä matalassa lämpötilassa eli -40°C :ssa, ja osa väriaineista ja huomattava osa molekyyleistä, jotka ovat suurempia tai pienempiä kuin insuliinimolekyyli, poistetaan mahdollisimman tarkasti ultrasuodattamalla käänteis-osmoosilaitteessa.

Voidaan käyttää useimpia saatavissa olevia ioninvaihtajatyyppejä, mm. hartsi- ja selluloosapohjaisia ioninvaihtajia ja tunnettuja Sephadex-ioninvaihtajia SP ja QAE, jotka ovat vastaavasti kationin- ja anioninvaihtajia. Ne ovat muunnettuja, ristiverkkoutettuja dekstraaniketjuja, joissa on kolmiulotteinen polysakkaridiverkosto (valmistaja Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Ruotsi). Suositeltavia ovat ioninvaihtajat SP-Sephadex[®] C-25 (kationinvaihtaja) ja QAE-Sephadex[®] A-25 (anioninvaihtaja).

Voidaan käyttää pylväskromatografiaa tai panoserotusta ioninvaihtajassa tai mahdollisesti molempia.

Panosmenetelmällä on osoittautunut olevan suurehkossa teollisessa käytössä huomattavia etuja puhdistuksen ollessa keskihienosta hienoon. Siten se sijoittuu käänteisosmoosierotuksen ja -väkevöinnin sekä pylväsmenetelmän mukaan ioninvaihtajalla suoritettun kromatografisen puhdistuksen väliin. Panoserotus on hyvin nopea menetelmä ja siihen ei liity ioninvaihtajan turpoamisesta tai kutistumisesta johtuvia teknisiä vaikeuksia. Ioninvaihtajalla erottaminen suoritetaan sitomalla epäpuhtaudet ioninvaihtajaan, jolloin insuliini jää vapaana liuokseen. Kun ioninvaihtaja on asettunut tasapainoon valitussa, sopivassa puskurissa insuliinin isoelektrisessä pisteessä pH 5,2, saatetaan konsentroitu, esipuhdistettu epäpuhtas insuliiniuute pH-arvossa 5,2 kosketukseen ioninvaihtajan kanssa ja sekoitetaan esim. kaksi tuntia, minkä jälkeen seos suodatetaan. Kaikki epäpuhtaudet sitoutuvat ioninvaihtajaan, ja puhdas insuliini pysyy liuenneena alkoholiuutteessa, koska insuliini isoelektrisessä pisteessä ei sitoudu ioninvaihtajaan.

Tämän menetelmän etuna on, että insuliinia ei tarvitse eluoida ioninvaihtajasta ja että insuliiniuute voidaan välittömästi suodatuksen jälkeen johtaa seuraavaan menetelmävaiheeseen.

Ioninvaihtajat regeneroidaan tunnettuun tapaan.

Toisaalta insuliini ja muut proteiinit voidaan sitoa ioninvaihtajaan ja sitten eluoida fraktioiden suspendoimalla seos uudelleen puskuriin, jolla on suurempi ioniväkevyys tai toinen pH. Jälkimmäisessä menetelmässä insuliinihäviö on pienempi kuin edellisessä menetelmässä ja siksi se on suositeltava.

Menetelmä voidaan pääpiirteittäin suorittaa esim. seuraavasti:

Turvotettiin kaksi vuorokautta 300 g kuivaa SP-Sephadex[®] C-25 ioninvaihtomassaa 1000 ml:ssa 0,1-m etikkahappopuskuria, joka sisälsi 62 % etanolia ja jonka pH oli 3. Käytetty puskuriliuos korvattiin tuoreella puskurilla useita kertoja. Turvotettu SP-Sephadex painoi 720 g.

Säädettiin pH arvoon 3,0 1000 ml uutetta, jota oli konsentroitua kymmenen kertaa osmoosin jälkeen ja jossa oli 18000 insuliiniyksikköä, ja sekoitettiin pyörivässä säiliössä (12 kierr./min) puolitoista tuntia. Mukana oli puolet adsorptioon tarvittavasta turvotetusta ioninvaihtajasta. Vakuumsuodatuksen jälkeen suodoksen adsorptiota jatkettiin puolitoista tuntia käyttämällä 360 g turvotettua ioninvaihtajaa. Pintanesteen insuliinipitoisuus oli 288 yksikköä, joka vastasi adsorptiohäviötä 1,6 %. Tällaisen kaksoisadsorption on havaittu alentavan häviön kolmannekseen yksittäisadsorptioon verrattuna.

Vaihdettiin puskuriksi 1000 ml liuosta, joka sisälsi 0,1-m HAc ja 0,075-m NaCl 62-% etanolissa, pH 3,0. Epäpuhtaudet eluoitiin tällä puskurilla ioninvaihtajasta sekoittamalla kaksi tuntia, jolloin insuliini ei eluoitunut.

Suodattamisen jälkeen vaihdettiin puskuriksi 1000 ml 0,1-m tris(hydroksimetyyli)aminometaania (tris) 62-% etanolissa, pH 8,0 ja insuliini eluoitiin ioninvaihtajasta SP. Insuliinipitoisuus oli 17000 yksikköä ja eluoimishäviö 4 %. Kokonaishäviö oli 5,6 %.

Ioninvaihtaja pestiin kahdesti siihen tarttuneiden insuliinijäännösten poistamiseksi.

Polyakryyliamidigeelielektroforeesissa (15 % polyakryyliamidia) insuliinivyohekkeen yläpuolella oli neljä osittain heikompa vyöhykettä, mutta alapuolella ei vyöhykettä ollut lainkaan. Tämä osoittaa, että osittain puhdistettu insuliini ei ole deamidoitunut puhdistusvaiheessa. Siinä ei ole desamidokomponentteja, eikä myöskään monodesamidoinsuliinia, mikä on aivan uutta insuliinin valmistuksessa.

Eluoinnin ja pesun jälkeen ioninvaihtajaa käsiteltiin sekoittaen hitaasti 2 - 3 tuntia 62-% etanolilla, johon oli lisätty 0,2 - 0,3 mol/l NaCl. Sitten ioninvaihtaja regeneroitiin tasapainopuskurilla, jonka pH oli 3, jolloin ioninvaihtaja saatiin täysin puhtaaksi liidunvalkoiseksi ja valmiiksi seuraavaa panosta varten.

Panosmenetelmä voidaan suorittaa edullisesti erikoisrakenteisessa Y-muotoisessa laitteessa, jonka kierrosluku on säädettävissä.

Tämä muoto mahdollistaa ioninvaihtajan erittäin tehokkaan ja varovaisen käsittelyn adsorption ja eluoinnin aikana. Samalla häviö sekä adsorptiossa että eluoinnissa vähenee minimiin. Koko menetelmä voidaan toteuttaa irroittamatta ioninvaihtajaa laitteesta, joka on varustettu suodatusjärjestelmällä ja vakuumisäiliöllä nesteen suodattamiseksi nopeasti ioninvaihtajasta.

Menetelmään kuuluu seuraavat vaiheet:

- 1) Insuliinin ja mahdollisesti muiden proteiinien adsorptio ioninvaihtajassa, pH 3, konsentroidusta epäpuhtaan insuliinin uutteen kahdessa vaiheessa, joiden välissä on vakuumisuodatus.
- 2) Proteiiniton uute vakuumisuodatetaan ja poistetaan.
- 3) Ioninvaihtaja pestään kaksi kertaa 62-% etanolipuskurilla, pH 3, ja pesunesteet poistetaan suodattamalla.
- 4) Epäpuhtaudet eluoidaan kaksi kertaa pH 3-puskurilla, ionivahvuus 0,075-m NaCl, sekoitusnopeus 12 kierr./min.
- 5) Eluaatti siinä olevine epäpuhtauksineen suodatetaan.
- 6) Ioninvaihtaja pestään kahdesti 62-% etanolipuskurilla, pH 3, ja suodatetaan.
- 7) Insuliini eluoidaan puskurilla, joka sisältää 0,1-m tris-(hydroksimetyyli)aminometaania 62-% etanolissa, pH 8. Koko seoksen eluoimisenesteen ja ioninvaihtajan, pH säädetään arvoon 8 tris-puskurilla. Ioninvaihtajan pH oli 3.
- 8) Insuliinipitoinen eluaatti suodatetaan.
- 9) Ioninvaihtaja pestään kahdesti siihen tarttuneiden insuliinijäännösten poistamiseksi.
- 10) Ioninvaihtaja puhdistetaan ja regeneroidaan.

Koko tuotantovaihe 1 - 9 kestää 12 tuntia ja ioninvaihtajan puhdistus ja regenerointi 4 tuntia eli yhteensä 16 tuntia.

Vaiheesta 7 saatu eluoimisuute voidaan pH-arvon ja ionivahvuuden säätämisen jälkeen johtaa suoraan kationin- tai anioninvaihtajaan pylvästekniikan tunnettujen menetelmien mukaan. Parhaiten tämä menetelmä sopii ohjelmoiduille, automaattifraktioinnilla varustetuille pylväille, jolloin eristetään insuliinikäyrän keskiosa, joka sisältää puhdasta insuliinia ja jossa polyakryyliamidigeelielektroforeesissa 15-% polyakryyliamidilla on vain yksi vyöhyke.

Viimeisen pylvään konsentroidusta, insuliinipitoisesta eluaattista voidaan insuliini eristää tavalliseen tapaan, so. laimentamalla

liuosta ja saostamalla esim. lisäämällä sinkki-ioneja.

Keksinnön mukaisesti on kuitenkin osoittautunut, että ei ole välttämätöntä laimentaa voimakkaasti väkevöityä alkoholivesiuutetta ennen saostamista. Uute voidaan suoraan saostaa esim. sinkki-ioneilla, kun niiden lisäys tapahtuu alhaisessa lämpötilassa, esim. -30°C - -45°C :ssa.

Niinpä suodokseen voidaan lisätä sinkkiasetaattiliuosta, min-kä jälkeen liuoksen annetaan olla vuorokausi -35°C :ssa. Tällöin insuliini saostuu kvantitatiivisesti esim. 62-% alkoholiliuoksesta. Saostunut insuliini eristetään linkoamalla, pestään esim. asetonilla ja kuivataan. Haluttaessa se voidaan myöhemmin kiteyttää.

Kuten mainittiin, keksinnön mukaisesti valmistettu insuliini on puhdas yksikomponentti-insuliini, jossa on vain yksi komponentti analysoitaessa polyakryyliamidigeelielektroforeettisesti (DISC PAGE) käyttäen 15-% polyakryyliamidia (tämän menetelmän yleisperiaatteen suhteen viitataan Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, s. 321 - 349 ja 404 - 427 (1964)).

Keksinnön mukaisesti valmistettu insuliini on osoittautunut erittäin pysyväksi verrattuna tunnettuihin pitkälle puhdistettuihin insuliineihin, joissa esim. varastoitaessa usein muodostuu lisää pieniä määriä desamidoinsuliinia. Syytä ei tiedetä, mutta mahdollisesti valmistetut insuliinit tarkasta puhdistuksesta huolimatta edelleen sisältävät pieniä määriä aineita, jotka hajottavat insuliinia.

Keksinnön mukainen insuliini ei hajoa tällä tavoin, mikä voi johtua siitä, että aineet, joiden molekyyl koko poikkeaa insuliinista, on saatu täydellisemmin poistetuksi.

Kuvatusta puhtaasta insuliinista voidaan valmistaa insuliini-valmisteita tunnettuun tapaan esim. liuottamalla ja/tai suspendoimalla amorfista ja/tai kiteistä insuliinia lihakseen tai suoneen annettavaan ruiskeeseen tai istutustekniikkaan sopivaan vesiliuokseen.

Esimerkki

Valmistettiin raakainsuliiniuute käsittelemällä hienonnettuja sian haimarauhasia 85-% etanolilla, jonka pH oli säädetty kolmeen rikkihapolla. Saatiin haimauute, joka sisälsi 65 % etanolia.

15 litran erä tätä uutetta (840 mg insuliinia + insuliinijohdannaisia ja epäpuhtauksia) käsiteltiin puhtaaksi insuliiniksi seuraavalla tavalla:

Uutteen pH säädettiin arvoon 8, ja tällöin saostunut aine, joka sisälsi suurimmaksi osaksi emäksiseen liuokseen liukenemattomia proteiineja, erotettiin insuliinin pysyessä liuenneena.

Liuoksen pH säädettiin arvoon 3, minkä jälkeen uute jäähdytettiin -35°C :seen ja sitä pidettiin tässä lämpötilassa kolmen tunnin ajan samalla sekoittaen. Sen jälkeen erottuneet rasvakiteet erotettiin sentrifugoimalla samassa lämpötilassa sentrifugissa, joka oli valmistettu erikoisen paljon lejeerattua terästä sisältävästä materiaalista, jolloin ei ole odotettavissa, että pyörivään kuulaan muodostuisi halkeamia alhaisen lämpötilan johdosta.

Neste, josta rasva oli erotettu, käsiteltiin 6 barin paineessa käänteisosmoosilaitteessa, jonka membraanit olivat tyyppiä GRX-6 (polysulfonimembraani, jota valmistaa De Danske Sukkerfabrikker A/S), minkä jälkeen insuliinin sisältävä permeaatti käsiteltiin 40 barin paineessa hypersuodatuslaitteessa, jonka membraanityyppi oli HMX-4 (polymeerimembraani, jota valmistaa De Danske Sukkerfabrikker A/S). Konsentraatti sisälsi insuliinin.

Täten insuliinipitoinen lähtöuute osittain puhdistettiin ja osittain väkevöitiin käänteisosmoosin avulla noin yhteen viidesosaan alkuperäisestä tilavuudestaan eli kolmeksi litraksi.

Väriaineet ja suolat poistettiin osittain konsentraatista hypersuodatuslaitteessa 65-% etanolilla käyttämällä samaa membraania kuin konsentroinnissa. Tämä membraanityyppi pidättää insuliinin, mutta väriaineet ja suolat pääsevät membraanin läpi.

Näin puhdistetun 660 mg insuliinia ja insuliinijohdannaisia sisältävän konsentraatin (3000 ml) pH säädettiin arvoon 3, ja konsentraatti käsiteltiin ioninvaihtolaitteessa, joka koostui Y-muotoisesta sekoituslaitteesta, joka oli varustettu suodatuslaitteella ja erillisellä osalla, jolla laitteeseen saatiin tyhjiö nesteen suodattamisen nopeuttamiseksi ioninvaihtajasta. Ioninvaihtajana käytettiin kationinvaihtajaa SP-Sephadex[®] C-25, jonka oli ennen käyttöä annettu turvota 65-% etanolipuskuriliuoksessa, joka sisälsi 0,1 moolia etikkahappoa yhtä litraa kohti ja jonka pH oli 3.

Ioninvaihtoprosessi (panosmenetelmä) koostui seuraavista vaiheista:

- 1) Kuivan ioninvaihtomassan (180 g) annettiin turvota puskuriliuoksessa, minkä jälkeen massa suodatettiin erilleen, minkä jälkeen 90 g ioninvaihtomassaa kaadettiin ioninvaihtolaitteeseen, tähän

lisättiin 3 litraa puhdistettua, väkevöityä insuliiniuutetta, ja sekoitettiin hitaasti. Tämän jälkeen liuos tyhjiösuodatettiin, ja prosessi toistettiin 90 g:lla ioninvaihtomassaa. Aika 2,5 tuntia.

2) Tuote tyhjiösuodatettiin, ja uute, josta proteiinit oli poistettu, johdettiin ioninvaihtolaitteesta tislaukskolonniin alkoholin regeneroimiseksi. Aika 2,5 tuntia.

3) Ioninvaihtaja pestiin kahdesti kulloinkin 200 ml:lla 65-% etanolipuskuriliuosta, jonka pH oli 3, ja pesuliuos suodatettiin erilleen. Aika 2 tuntia.

4) Epäpuhtaudet eluoitiin 400 ml:lla puskuria, jonka pH oli 6 ja ionivahvuus 0,025 mol/l, sekoitusnopeuden ollessa 12 kierr./min. Aika 1 tunti.

5) Eluointiliuos ja siihen liuenneet epäpuhtaudet suodatettiin erilleen. Aika 1,5 tuntia.

6) Ioninvaihtaja pestiin kahdesti kulloinkin 200 ml:lla 65-% etanolipuskuriliuosta, jonka pH oli 6, ja pesuliuos suodatettiin erilleen. Aika 1,5 tuntia.

7) Insuliini eluoitiin 200 ml:lla 65-% etanolipuskuriliuosta, joka sisälsi 0,033 moolia fosfaattia yhtä litraa kohti ja jonka pH oli 8. Koko seoksen, eluointiliuoksen ja ioninvaihtajamassan pH säädettiin arvoon 8 NaOH:lla. Ioninvaihtomassan pH oli 3. Eluointi suoritettiin 2 tunnissa hitaasti sekoittaen.

8) Insuliinia ja yksinkertaisia insuliinijohdannaisia sisältävä eluointiliuos suodatettiin erilleen. 200 ml eluointipuskuriliuosta sisälsi 580 mg insuliinia + johdannaisia. Aika 30 min.

9) Ioninvaihtaja pestiin kahdesti kulloinkin 100 ml:lla kohdassa 7) mainittua puskuriliuosta ioninvaihtajaan jääneiden insuliinijäännösten poistamiseksi. Pesuliuokset yhdistettiin seuraaviin eriin. Aika 2 tuntia.

10) Ioninvaihtaja puhdistettiin ja regeneroitiin.

Koko prosessi (vaiheet 1 - 9) kestää 12 tuntia ja ioninvaihtajan puhdistus ja regenerointi 4 tuntia, yhteensä 16 tuntia.

Vaiheesta 7 saatu 200 ml:n eluointiuute sisältää edellä selostettujen puhdistusvaiheiden jälkeen erittäin puhdasta insuliinia. Kyseessä olevalla menetelmällä puhdistettu insuliiniuute ei sisällä lainkaan monodesamidoinsuliinia, jonka vyöhyke elektroforeettisessa

analyysissä sijaitsee insuliinin vyöhykkeen alapuolella, sensijaan insuliinin vyöhykkeen yläpuolelta löytyy kaksi ylimääräistä vyöhykettä, jotka aiheutuvat arginiini-insuliinista ja insuliinin etyyliesteristä.

Vaiheesta 7 saadun eluointiutteen (200 ml:ssa 580 mg insuliinia ja insuliinijohdannaisia) pH säädettiin arvoon 7,5 ja ionivahvuus 0,05:ksi, minkä jälkeen uutteelle suoritettiin lisäpuhdistus anioninvaihtajassa DEAE Sephadex[®] C-25 käyttämällä ohjelmoitua kolonnia, johon oli liitetty automaattinen fraktiointi. Ioninvaihtomassan annettiin turvota 0,033-m fosfaattipuskuriliuoksessa, joka sisälsi 65 % etanolia ja jonka pH oli 7,5. Kolonnin halkaisija oli 2,5 cm, siihen oli pakattu ioninvaihtomassaa 18 cm:n korkeudelle.

200 ml vaiheesta 7 saatua eluointiutetta kaadettiin kolonniin. Eluointiin käytettiin 900 ml edellä mainittua fosfaattipuskuria (lämpötila 20°C), eluointinopeus oli 100 ml/h, ja eluaatti kerättiin 18 ml:n fraktioina. Eluoinnin kulku rekisteröitiin. Insuliinia eniten sisältävät fraktiot yhdistettiin, ja tällöin saatiin 125 ml eluaattia, joka sisälsi 310 mg monomeerista insuliinia. Elektroforeettisessa analyysissä polyakryyliamidigeelissä (15 % polyakryyliamidia) havaittiin ainoastaan yksi vyöhyke eli insuliinivyöhyke.

Eluaattiin lisättiin 12 ml 1-m sinkkiasetaattiliuosta, ja sitä pidettiin 24 tuntia -35°C:ssa, jolloin puhdas amorfinen insuliini saostui kvantitatiivisesti.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä insuliinin, kuten sian insuliinin, valmistamiseksi, joka on puhdistettu niin pitkälle, että vain yksi ainoa komponentti on todettavissa, kun se analysoidaan polyakryyliamidigeelielektroforeettisesti käyttäen 15 % polyakryyliamidia sisältävää geeliä, jossa menetelmässä haimarauhasista valmistetaan insuliiniuute, joka käsitellään edelleen puhtaaksi insuliiniksi, t u n n e t t u siitä, että insuliini uutetaan sellaisella uuttoaaineella, jossa ei tapahdu insuliinin entsyymaattista hajoamista eikä aggregaattien muodostusta, kuten veden ja orgaanisen liuottimen, edullisesti alkoholin tai asetonin, seoksella, joka uuttoaaine sisältää vähintään 50 tilavuus-% orgaanista liuotinta, jolloin osa uuttoaineen sisältämästä vedestä on peräisin haimarauhasista, ja pidetään insuliini koko käsittelyprosessin ajan lopputuotteen eristämiseen saakka liuotettuna mainittuun liuottimeen tai perättäin useisiin erilaisiin saman tyyppisiin liuottimiin liuotettuna, jolloin uuttoa seuraava käsittelyprosessi käsittää seuraavat päävaiheet:

rasvan poisto insuliinista, edullisesti jäähdyttämällä uute voimakkaasti, esimerkiksi lämpötilaan alle -25°C ja erottamalla sen jälkeen muodostuneet rasvakiteet,

rasvattoman insuliiniliuoksen väkevöinti, edullisesti käänteisosmoosin avulla,

väkevöidyn liuoksen edelleen puhdistaminen, edullisesti käsittelemällä ioninvaihtajalla,

kunnes tuloksena on puhdas insuliini liuotettuna epäpuhtauksista vapaaseen liuottimeen, jonka jälkeen mahdollisesti saostetaan insuliini.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että rasvan poistamisen jälkeen uutetta väkevöidään ja puhdistetaan käänteisosmoosin avulla, jolloin käytetään peräkkäin membraaneja, joilla saadaan poistetuksi vastaavasti sellaiset epäpuhtaudet, joiden molekyylit ovat suurempia kuin monoinsuliinilla, ja sellaiset epäpuhtaudet, joiden molekyylit ovat pienempiä.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käänteisosmoosista saatua insuliinipitoista uutet-

ta pestään osmoosilaitteessa, jossa on sellainen membraani, joka aikaansaa väriaineiden ja suolojen poistamisen uutteesta.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että puhdistettua väkevöitettä puhdistetaan edelleen ioninvaihdolla, jolloin suoritetaan ensimmäinen ioninvaihto panosmenetelmänä, ja saatua insuliinipitoista nestefaasia puhdistetaan edelleen yhden tai useamman kerran ioninvaihtopylväskromatografian avulla.

5. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että insuliini eristetään saadusta väkevöidystä puhdistetusta liuoksesta saostamalla metalli-ioneilla, mieluiten sinkki-ioneilla, voimakkaasti jäähdyttäen esim. -30°C ... -45°C :seen.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av insulin, såsom insulin av svin, vilket har renats i en sådan grad, att det uppvisar endast en enda komponent vid analysering med polyakrylamidgelelektrofores under användning av en gel innehållande 15 % polyakrylamid, vid vilket förfarande framställs ett extrakt av insulin från bukspottkörtlar vilket extrakt upparbetas till rent insulin, k ä n n e t e c k n a t därav, att insulinet extraheras med ett sådant extraheringsmedel, i vilket icke sker enzymatisk nedbrytning av insulinet eller bildning av aggregat, såsom med en blandning av vatten och ett organiskt lösningsmedel, lämpligen en alkohol eller aceton, vilket extraheringsmedel innehåller minst 50 volym-% organiskt lösningsmedel, varvid en del av det i extraheringsmedlet ingående vattnet härstammar från bukspottkörtlarna, och hålles under hela upparbetningsprocessen av insulin intill separeringen av slutprodukten upplöst i nämnda lösningsmedel, eller successivt i flera olika lösningmedel av samma typ, varvid den på extraktion följande upparbetningsprocessen omfattar följande huvudsteg:

avlägsnande av fett från insulinet, lämpligen genom kraftig avkylning av extraktet, t.ex. till en temperatur under -25°C , och genom att därefter separera de bildade fettkristallerna,

koncentrering av den från fett befriade insulinlösningen, lämpligen medelst omvänd osmos,

ytterligare rening av den koncentrerade lösningen, lämpligen genom behandling i jonbytare,

tills det rena insulinet föreligger upplöst i ett från föroreningar befriat lösningsmedel, varefter insulinet möjligen utfälls.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att extraktet efter avlägsnande av fett koncentreras och renas medelst omvänd osmos, varvid successivt användes membraner, med vilka kan avlägsnas sådana föroreningar, vilka har större molekyler än monoinsulinet, respektive sådana föroreningar, vilka har mindre molekyler än monoinsulinet.

3. Förfarande enligt patentkravet 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att det insulinhaltiga koncentratet från den omvända

osmosen tvättas i en osmosapparat försedd med ett sådant membran, med vilket åstadkommes avlägsnande av färgämnen och salter från koncentratet.

4. Förfarande enligt patentkravet 3, k ä n n e t e c k - n a t därav, att det renade koncentratet underkastas en ytterligare rening genom jonbyte, varvid man företager ett första jonbyte som batchprocess, varefter den erhållna insulinhaltiga vätskefasen underkastas en eller flera ytterligare reningar medelst jonbytarkolonnkromatografi.

5. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 4, k ä n - n e t e c k n a t därav, att insulinet utvinnes från den erhållna koncentrerade renade lösningen genom utfällning med metalljoner, företrädesvis zinkjoner, under stark avkylning till t.ex. -30°C ... -45°C .

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia:-Offentliga finska patentansökningar: 2276/69 (A 61 K 37/26), 760058 (A 61 K 37/26).

Patenttijulkaisuja:-Patentskrifter: Suomi-Finland(FI) 52 522 (A 61 K 37/26).

Muita julkaisuja:-Andra publikationer:

Schlichtkrull J. et al., Die Chemie des Insulins, i Handbuch der inneren Medizin. Band 7, Teil 2 A, Springer-Verlag 1975, 77-127.

Schlichtkrull J. et al., Insulin Preparations with Prolonged Effect i Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 32/2, Springer-Verlag 1975, 729-777.