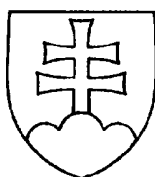


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

- (21) Číslo prihlášky: 2717-91
(22) Dátum podania: 04.09.91
(31) Číslo prioritnej prihlášky: P 40 28 120.5
(32) Dátum priority: 05.09.90
(33) Krajina priority: DE
(43) Dátum zverejnenia: 18.03.92
(45) Dátum oznámenia o udelení vo Vestníku: 10.01.96
(86) Číslo PCT:

(11) Číslo dokumentu:

278099

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 K 14/62
C 07 K 1/16
A 61 K 38/28

(73) Majiteľ patentu: Hoechst Aktiengesellschaft, Frankfurt am Main, DE;

(72) Pôvodca vynálezu: DICKHARDT Rainer Dr., Kelkheim/Taunus, DE;
UNGER Bernhard Dr., Kelkheim/Taunus, DE;
HÄFNER Leonard Dr., Königstein/Taunus, DE;

(54) Názov vynálezu: **Spôsob čistenia inzulínu a/alebo inzulínových derivátov chromatografiou**

(57) Anotácia:

Spôsob čistenia inzulínov a inzulínových derivátov sa uskutočňuje chromatografiou vo vodných pufrovaných rozpúšťadlách, ktoré obsahujú s vodou miešateľné organické rozpúšťadlá, na lipofilne modifikovanom silikagéli, pričom vodné, pufrované rozpúšťadlá obsahujú obojaké ióny, alebo hodnota pH znesie rozpúšťadlá je v blízkosti izoelektrického bodu čisteneho inzulínu alebo derivátu inzulínu a sú prítomné obojaké ióny.

Oblasť techniky

Vynález sa týka spôsobu čistenia inzulínu a/alebo inzulínových derivátov chromatografiou vo vodných pufrovaných rozpúšťadlách, ktoré obsahujú s vodou miešateľné organické rozpúšťadlá, na lipofilne modifikovanom silikagéli.

Doterajší stav techniky

Z analytických deliacich postupov je čistenie inzulínu alebo inzulínových derivátov na lipofilne modifikovaných silikagéloch známe a veľa rokov sa vo vysokotlakovej kvapalinovej chromatografii (HPLC) úspešne používa (WS Welinder et al., J. Chrom., 361 (1986) 357 - 367). V analytickej mierke sa proteínové množstvá v μg -rozsahu nanášajú na stĺpec z ocele, zo skla alebo zo syntetickej hmoty, plnený modifikovaným silikagélom a potom sa prúdiacou kvapalinovou zmesou eluuje (spravidla kyslé, vodné roztoky pufrov, s konštantnou alebo premennou koncentráciou organických rozpúšťadiel). Obsah proteínov je pritom oveľa menej ako 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ objemu stĺpca.

Doterajšie čistiace postupy používajú často v laboratóriu používané, relatívne toxické rozpúšťadlá (acetonitril) a korozívne, drahé pufrové komponenty, napríklad tetraalkylamóniové soli, alkylsulfonáty, hexafluóracetón, trifluóracetát (E. P. Kroeff et al., J. Chrom., 461 (1989) 45 - 61). Tieto rozpúšťacie prostriedky nevedú pri zmesiach silnejšie znečistených látkami podobnými inzulínu k uspokojivému preparatívnemu deleniu vzhľadom na kvalitu, výťažok hlavného komponentu a celkového spätného získania (J. Rivier, R. McClintock, J. Chrom., 268 (1983) 112 - 119; Peter et al., J. Chrom., 408 (1987) 43 - 52).

Inzulíny zo skorších chemických premien, ako napríklad zo silne kyslých esterových štiepení alebo enzymatických (trans)-peptidizačných procesov, kryštalizačných čistení a podobne, obsahujú spravidla sprievodné látky s podobnými vlastnosťami. Nechajú sa čistiť voľbou určitej hodnoty pH chromatografiou na iónomeničoch, kedy sú dostatočné rozdiely elektrického náboja (US 4 129 560). Nevýhoda tejto metódy spočíva v zriedzovacom efekte, a tým v stratách cenných látok v prebytkoch pri spracovaní zrazením, v relatívne dlhej dobe cyklu alebo v tom, že je malé spätné získanie, a tým malé výťažky.

Preparatívne delenie je možné principiálne dosiahnuť zväčšením obsahu stĺpca, množstva zaťaženia a prechodu eluačného prostriedku. Množstvá organických rozpúšťadiel tu potrebných ležia napríklad pri stĺpcoch s priemerom $> 20 \text{ cm}^3$ - mierke. Rozpúšťadlá používané na analytickú HPLC (napríklad acetonitril, DMF, metanol, dioxan, atď.) sú toxické, takže používanie týchto metód v preparatívnej miere produkcie vyžaduje nákladné ochranné opatrenia.

Podstata vynálezu

Úlohou predloženého vynálezu je vyvinúť spôsob chromatografického čistenia inzulínov a inzulínových derivátov, pri ktorom by zostala zachovaná biologická aktivita inzulínu, dosiahla sa vysoká čistota jedným chromatografickým postupom, krátkodobé cykly, životnosť stĺpca viac ako 50 chromatografických cyklov, re-

generácia stacionárnej silikagélovej fázy bez časovo náročných tesniacich postupov a nasadenie netoxických rozpúšťadiel tak, aby bola možná preparatívna miera produkcie.

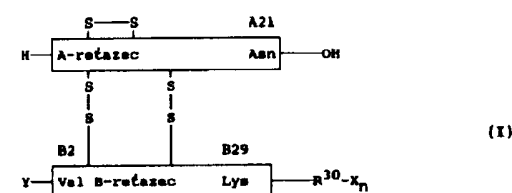
V súčasnosti bol nájdený spôsob, ktorým je možné inzulín a deriváty inzulínu čistiť chromatografiou vo vodných, pufrovaných rozpúšťadlách obsahujúcich s vodou miešateľné organické rozpúšťadlá, na lipofilne modifikovanom silikagéli, ktorý spočíva v tom, že sú v pufrovaných rozpúšťadlách rozpustené obojaké ióny, alebo hodnota pH rozpúšťadla leží blízko izoelektrického bodu čisteného inzulínu alebo derivátov inzulínu a sú prítomné obojaké ióny.

Prekvapujúco prítomnosť obojakých iónov alebo chromatografia pri hodnote pH rozpúšťadla, ktorá leží v blízkosti izoelektrického bodu čisteného inzulínu alebo derivátov inzulínu a prítomnosť obojakých iónov, spôsobuje nielen dobré delenie hodnotného produktu a nečistôt, ale i dobré oddelenie proteínov od stacionárnej fázy (lipofilne modifikovaný silikagél). Dosiahnuté delenie dovoľuje čistiť inzulínové roztoky silne znečistené komponentmi podobnými inzulínu, ako napríklad oddeľovanie A21-des-amidoinsulínu od inzulínu a inzulínových derivátov. Ďalej sa dobrým oddelením proteínov od pevnej fázy umožňuje dlhá životnosť stĺpcových tesnení a vysoký stupeň získavania inzulínu.

Vynález sa teda týka spôsobu čistenia inzulínu a/alebo inzulínových derivátov chromatografiou vo vodných, pufrovaných rozpúšťadlách, ktoré obsahujú s vodou miešateľné organické rozpúšťadlá, na lipofilne modifikovanom silikagéli, ktorý spočíva v tom, že sú v pufrovaných rozpúšťadlách rozpustené obojaké ióny, alebo hodnota pH zmesi rozpúšťadiel leží v blízkosti izoelektrického bodu čisteného inzulínu alebo derivátu inzulínu a sú prítomné obojaké ióny.

Pri spôsobe podľa vynálezu sa môžu nasadiť všetky inzulíny, ako napríklad inzulíny všetkých species, ktoré sú zvieracieho alebo ľudského pôvodu, inzulínové predné frakcie, ako napríklad proinsulíny alebo preproinsulíny, alebo rekombinantné inzulíny alebo deriváty inzulínu, ktoré sa exprimujú od geneticky modifikovaných mikroorganizmov. Ďalej sa tiež môžu nasadzovať deriváty inzulínu, ktoré sú vyrobené napríklad chemickou alebo enzymatickou derivatizáciou, napríklad s Des-Phe-B1-insulín, inzulín- β -keténsulfonát, diarginíninsulín (B31, B32), monoarginíninsulín alebo difenylalaníninsulín (B31, B32) (US 4 601 852).

Výhodne sa používajú deriváty inzulínu vzorca I



v ktorom znamená R^{30} zvyšok geneticky kódovateľnej L-aminokyseliny, X hydroxyskupinu, fyziologicky nezávadnú organickú skupinu základného charakteru s až 50 atómami uhlíka, geneticky kódovateľnú L-aminokyselinu a jej prípadne prítomná koncová karboxylová funkcia môže byť voľná, ako esterová funkcia, ako amidová funkcia, ako laktón alebo redukovaná na CH_2OH ; n celé číslo 0 až 10; Y vodík alebo L-fenylalanín a A- a B- reťazce sú reťazce zvieracieho alebo ľudského inzulínu.

Obzvlášť výhodne sa používajú inzulínové deriváty vzorca I, v ktorom znamená R³⁰ L-alanín alebo L-treonín a X jednu alebo niekoľko L-aminokyselín zo skupiny L-arginín, L-lyzín alebo L-fenylalanín.

Inzulín a inzulínové deriváty sa môžu nasadzovať tak v pomerne nečistom stave, ako aj v predčistenej forme (napríklad chromatografiou na geli). Inzulín je po niekoľkonásobnej kryštalizácii a i po chromatografii na geli ešte znečistený sprievodnými látkami podobnými inzulínu s veľmi podobnou molekulovou hmotnosťou, ktoré sa pri vhodne volenom pH vo svojom stave nábojov navzájom a od inzulínu odlišujú, ale tvoria s inzulínom komplexy (US 4 129 560). Príkladmi takýchto látok sú dezamidoinzulín, arginíninzulín a diarginíninzulín, inzulín-etylster a iné.

Pod lipofilne modifikovaným silikagélom sa chápe silikagél, na ktorý je nanosená hydrofóbná matica. Príkladmi pre hydrofóbnú maticu sú alkány s dĺžkou reťazca 3 až 20 atómov uhlíka. Obzvlášť výhodné lipofilne modifikované silikagélové materiály sú napríklad:

- (R)Nucleosil, firma Macherey a Nagel:

sférické a nesférické materiály rôznej veľkosti zrn až do 45 µm, vzdialenosť pórov Å modifikované C8, prípadne C18

- (R)Lichroprep, firma Merck:

nesférické a sférické materiály rôznej veľkosti zrn až 40 µm, vzdialenosť pórov 60 - 250 Å, C8 - C18 modifikované

- (R)Lichrospher Select B, firma Merck:

sférický materiál veľkosti zrn až 25 µm, C8-modifikovaný

- (R)Waters Prep, C18-modifikovaný, 50 - 105 µm, nesférický, vzdialenosť pórov 100 Å

- (R)Zorbax Pro10, firma DuPont:

C8-modifikovaný, 10 µm, sférický, vzdialenosť pórov 100 Å

- (R)Kromasil, firma EKA Nobel:

C4-, C8-C18-modifikovaný, až 16 µm, sférický, vzdialenosť pórov 100, 150 alebo 200 Å.

Obojaké ióny sú zlúčeniny, ktoré môžu prijímať a tiež odštiepovať protóny, t.j. tvoria v kyslom roztoku kationy a v alkalickom roztoku anióny, ako napríklad α-aminokyseliny, betain alebo deriváty betainu. Výhodné obojaké ióny sú glycin, glutamín alebo betain (N-trimetyl-glycin). Obzvlášť výhodný je glycin.

Izoelektrickým bodom (IEB) inzulínu alebo derivátov inzulínu je taká hodnota pH roztoku inzulínu, v ktorej počet kationových nábojov a aniónových nábojov rozpusteného inzulínu sa rovná nule. Napríklad IEB bravčového inzulínu je medzi pH 5,3 a 5,4 (H. Neurath, K. Bailey, Protein Hormones, zv. II/A, The Proteins, str. 636). Pojmom "v blízkosti izoelektrického bodu" sa mienia hlavne hodnoty pH, ktoré ležia cca o 1 pH jednotku nad alebo od IEB čisteného inzulínu. Obzvlášť výhodné sú hodnoty pH, ktoré ležia až do 0,5 pH jednotky nad alebo pod IEB.

Eluačné prostriedky obsahujú pufrovací látku, aby sa hodnota pH eluačného prostriedku udržiavala konštantná. Vhodné pufracie látky sú známe z literatúry, napríklad fosfáty, soli alkalických kovov a kovov alkalických zemín ako citran sodný alebo octan draselný, citran amonný, octan amonný, síran amonný alebo chlorid amonný. Ďalej eluačné prostriedky obsahujú s vodou miešateľné organické rozpúšťadlá ako napríklad alkoholy, ketóny, metylacetát, dioxan, dimetylsulfoxid alebo acetonitril. Výhodné sú alkoholy ako n-propanol alebo izopropanol, metanol, etanol alebo metylacetát.

Koncentrácia s vodou miešateľných organických rozpúšťadiel je medzi 1 a 90 %, výhodne 10 až 60 %, obzvlášť výhodne medzi 10 a 35 %. Koncentrácia pufracej látky je medzi 1 mmól/l a 2 mól na liter vzťahujúc na vodu ako rozpúšťadlo, výhodne medzi 25 mmól/l a 1 mól/l. Koncentrácia obojakých iónov môže kolísť v širokom rozsahu. Výhodné množstvá ležia medzi 10 mmól/l a 1 mól/l vzťahujúc na vodu ako rozpúšťadlo, hlavne medzi 20 mmól/l a 500 mmól/l.

Teplota počas chromatografie je medzi 0 °C a 50 °C, výhodne medzi 15 a 30 °C, obzvlášť výhodne medzi 15 a 20 °C. Prevádzkový tlak v priebehu chromatografie je konštantný. Chromatografia sa môže vykonávať rôznym tlakom, napríklad sa chromatografia môže vykonávať pri tlaku 5 až 400.10⁵ Pa, hlavne pri 20 až 100.10⁵ Pa.

Zaťaženie stĺpcov, chromatografia a elúcia inzulínu a derivátov inzulínu sa vykonáva známymi, zvyčajnými, technickými metódami. Zaťaženie stĺpca čístejším roztokom inzulínu sa výhodne vykonáva vodným, alkoholickým alebo čisto vodným roztokom pufru. Roztok inzulínu má podiel proteínu, ktorý je medzi 1 a 10 %, výhodne okolo 3 %.

Elúcia inzulínu sa spôsobom podľa vynálezu vykonáva pri konštantnej koncentrácii pufracej látky (izokraticky) alebo zmenou podielu s vodou miešateľného organického rozpúšťadla pri pufré. Zmena podielu organického rozpúšťadla sa vykonáva tým spôsobom, že koncentrácia použitého organického rozpúšťadla v závislosti od eluačného objemu stúpa, a to výhodne lineárne.

Oddeľovanie inzulínu z eluátov po chromatografii sa vykonáva zrážaním zinkom alebo kryštalizáciou. Pritom sa roztok môže najprv pomocou vákuovej destilácie zbaviť rozpúšťadla a jeho koncentrácia redukovat' zriedením vodou. V každom prípade by mala koncentrácia rozpúšťadla pred zrážaním alebo pred kryštalizáciou byť okolo 10 % alebo nižšie, aby sa obsah proteínu v prebytku udržiaval na < 50 mg/l. Vznikajúce čisté inzulínové zrazeniny sa nechajú izolovať dekantáciou, odstredením alebo filtráciou a sušia sa.

Spôsob podľa vynálezu sa hodí nielen na analytickú chromatografiu, ale i na preparatívnu chromatografiu, hlavne keď sa spôsob podľa vynálezu vykonáva v preparatívnom zariadení na vysokotlakovú kvapalinovú chromatografiu.

Pod pojmom "preparatívna chromatografia" sa rozumie čistiaci postup s cieľom získať čisté produkty, a nie iba na analyzovanie. Množstvo čistých produktov môže kolísť v širokých hraniciach, napríklad od 1 mg do 50 kg, výhodne medzi 50 mg a 15 kg.

V nasledujúcich príkladoch sa spôsob podľa vynálezu popisuje v jednotlivostiach. Percentuálne údaje sa vzťahujú na hmotnosť, ak nie je uvedené inak.

Príklady vyhotovenia vynálezu

Príklad 1

Pufer A: 0,2 M síran amonný, 0,1 M glycin, 0,05 M citran sodný, pH 5,5, čiste vodný
Pufer B: 0,1 M síran amonný, 0,1 M glycin, 0,05 M citran sodný, pH 5,5, voda/n-propanol v pomere 1:1
Sorbens: Nucleosil C18, 15 - 25 µm sférický, 100 Å vzdialenosť pórov, fma. Macherey a Nagel, Düren
Rozmery stĺpca: 40 mm x 250 mm.

Zaťaženie stĺpca sa vykoná 3,5 ľudského inzulínu

(LI) získaného štiepením ľudského inzulínu-B30-di-terc. butyl -ester/ éteru kyselinou trifluóroctovou, s podielom proteínu 79,1 %. Eluácia inzulínu sa vykonáva tým, že sa roztok pufru A a B zmieša pomocou vysokotlakového čerpadla a miešacieho zariadenia, takže sa pripraví propanolový gradient 14 až 20 %. Eluácia inzulínu sa vykonáva pri asi 17,5 % propanolu po 23 minútach, keď sa čerpá 46 ml/min.

Po frakcionácii a izolácii kryštalizovaného ľudského inzulínu (LI) sa získa produkt s 97 % proteínu v 88,5 % výťažku v hlavnej frakcii a 7,5 % výťažok vedľajšej frakcie s 85,7% proteínového podielu. Celkový zisk je tak 96,0 % predloženého inzulínu.

Príklad 2

Pufer A: 0,1 M síran amonný, 0,1 M glycin, 0,025 M citran sodný, pH 5,5, čiste vodný

Pufer B: 0,05 M síran amonný, 0,1 M glycin, 0,025 M citran sodný, pH 5,5, voda/n-propanol v pomere 1:1

Sorbens: Nucleosil C18-P, 15 - 25 µm sférický, 100 Å vzdialenosť pórov, firma. Macherey a Nagel, Düren

Rozmery stĺpca: 40 mm x 250 mm.

Stĺpec sa pomocou vysokotlakového čerpadla zaťaží 7,0 g ľudského inzulínu (LI) (86,1 % podielu proteínu) z esterového štiepenia ľudského inzulínu-di-terc. butyl-ester/éter vo forme 3 % roztokov v 0,1 M pufru glycin/HCl, pH 2,8. Potom sa vykoná eluácia roztokmi hore opísaných roztokov pufrův pod tlakom v n-propanolovom gradiente. V priebehu 60 minút stúpa koncentrácia propanolu zo 14 na 17,5 %. Po frakcionácii a kryštalizácii hore popísaným spôsobom sa získa produkt s 98,7 % podielu proteínu. Výťažok čistého ľudského inzulínu je okolo 91 % nasadeného inzulínu.

Príklad 3

Pufer A: 0,1 M síran amonný, 0,1 M glycin, 0,025 M octan sodný, pH 5,5, čiste vodný

Pufer B: 0,05 M síran amonný, 0,1 M glycin, 0,025 M octan sodný, pH 5,5, voda/n-propanol v pomere 1:1

Sorbens: Lichrospher Select B, C8, 15 - 25 µm sférický, 60 Å vzdialenosť pórov, firma. Merck

Rozmery stĺpca: 50 mm x 250 mm.

Stĺpec sa zaťaží roztokom 10 g reakčnej zmesi pre-amidácie - bravčového inzulínu trypsinom, rozpustené v 200 ml 0,1 M pufru glycin/HCl, pH 2,8. V priebehu 120 minút sa pri toku 40 ml/min. a zvýšení koncentrácie propanolu zo 14 na 30 % oddelene elujú jednotlivé proteínové komponenty. Po kryštalizácii, prípadne zrážaní a sušení sa ako hlavná frakcia získa ľudský inzulín-B30-di-terc. -butyl-treonín-ester/éter s čistotou > 97 % s výťažkom 93 % vzťahujúc na nasadený inzulín.

Príklad 4

Pufer A: 0,1 M chlorid sodný, 0,1 M glycin, 0,025 M octan sodný, pH 5,5, čiste vodný

Pufer B: 0,05 M chlorid sodný, 0,1 M glycin, 0,025 M octan sodný, pH 5,5, voda/n-propanol v pomere 1:1

Sorbens: Zorbax Pro10, C8, 10 µm firma. DuPont

Rozmery stĺpca: 5 cm x 25 cm.

7,5 g LI zo štiepenia ľudského inzulínu-B30-di-terc. butyl-treonín-ester/éteru kyselinou trifluóroctovou v 100 ml 0,1 M roztoku glycin/HCl sa čerpá na stĺpec a pri toku 80 ml/min sa eluje. Koncentrácia pufru B počas 60 minút stúpa z 18 na 25 %. Doba retencie (Rt) je tu cca 37 minút. Z hlavnej frakcie sa nechá po kryštalizácii a sušení izolovať 96,8 % LI z násady s > 97 % čistoty, vedľajšia frakcia obsahuje 2,2 % L s čistotou < 50 %.

Príklad 5

Pufer A: 0,2 M síran sodný, 0,1 M glycin, 0,03 M octan amonný, pH 5,5, 10 % metylacetátu

Pufer B: 0,05 M síranu sodného, 0,1 M glycin, 0,03 M octan amonný, pH 5,5, 20 % metylacetátu

Sorbens: Kromasil C8, 13 µm, 100 Å vzdialenosť pórov, firma. EKA Nobel

Rozmery stĺpca: 5 cm x 25 cm.

8 g hovädzieho inzulínu na liter objemu stĺpca sa pomocou 0,1 M pufru glycin/HCl naniesie na stĺpec, ekvilibrovaný pri 30 % pufru B. V priebehu 90 minút koncentrácia pufru B stúpa na 80 % (= 18 % metylacetátu). Hovädzí inzulín eluuje po 65 minútach s čistotou > 97,5 % v hlavnej frakcii (63,5 % výťažku) a po zriedení vodou sa zráža chloridom zinočnatým. Celkový zisk je 92,5 %.

Príklad 6

Pufer A: 0,1 M síran amonný, 0,1 M glycin, 0,025 M octan sodný, pH 5,5, 5 % n-propanol

Pufer B: 0,05 M síran amonný, 0,1 M glycin, 0,025 M octan sodný, pH 5,5, voda/n-propanol v pomere 1:1

Sorbens: Kromasil C8, 13 µm, 100 Å vzdialenosť pórov, firma. EKA Nobel

Rozmery stĺpca: 5 cm x 25 cm.

Zaťaženie stĺpca je 4 g (= 8 g/l) ľudského inzulínu zo štiepenia ľudského inzulínu-B30-di-terc. butyl-treonín-ester/éteru kyselinou trifluóroctovou s čistotou cca 92 %. V gradiente z 18 na 25 % pufru B počas 90 minút eluuje ľudský inzulín po 45 minútach s čistotou > 97 % v hlavnej frakcii (výťažok 91,8 %) a 80,5 % vo vedľajšej frakcii (výťažok 4,7 %).

Príklad 7

Pufer A: 0,1 M síran amonný, 0,1 M glycin, 0,025 M octan sodný, pH 5,5, 10 % n-propanol

Pufer B: 0,05 M síran amonný, 0,1 M glycin, 0,025 M octan sodný, pH 5,5, voda/n-propanol v pomere 1:1

Sorbens: Kromasil C8, 13 µm, 100 Å vzdialenosť pórov, firma. EKA Nobel

Rozmery stĺpca: 10 cm x 40 cm.

Na stĺpec sa dá 18 g bravčového inzulínu v 1,8 l 0,1 M pufru glycin/HCl, pH 3,0, s 5 % n-propanolu. Gradient prebehne z 9 % pufru B (= 13,6 % n-propanolu) na 11 % pufru B (= 14,4 % n-propanolu) v 70 minútach. Bravčový inzulín eluuje po 50 minútach s obsahom proteínu > 98 % v hlavnej frakcii (89 % výťažku). Celkový zisk je 96,8 % násady.

Príklad 8

Pufer A: 0,2 M chlorid amonný, 0,1 M glycin, 0,025 M citran sodný, 5 % n-propanol, pH 5,5

Pufer B: ako pufer A, ale s prídavkom 50 % n-propanolu

Sorbens: Kromasil C8, 13 µm, 100 Å vzdialenosť pórov, firma. EKA Nobel, Švédsko

Rozmery stĺpca: 50 mm x 250 mm.

4 g génovou technikou vyrobený ľudský inzulín (89,5 % podielu proteínu) sa rozpustí v 0,1 M glycinovom pufru, pH 3,0, ako 2 % proteínový roztok a vysokotlakovým čerpadlom sa čerpá na stĺpec. Eluácia prebehne lineárnym gradientom z 13 % na 16 % n-propanolu počas 70 minút pri toku 80 ml/min. Po frakcionizácii a kryštalizácii sa získa v hlavnej frakcii ľudský inzulín s obsahom proteínu 98 % s výťažkom 93 %. Celkový zisk je okolo 98 % vzťahujúc na násadu.

Príklad 9

Pufer A: 0,2 M síran amonný, 0,1 M glycín, 0,025 M citran amonný, 5 % etanol, pH 5,5

Pufer B: ako pufer A, ale s prídavkom 50 % etanolu

Sorbens: Kromasil C8, 10 µm, 100 Å vzdialenosť pórov, fma. EKA Nobel, Švédsko

Rozmery stĺpca: 50 mm x 250 mm.

V 250 ml glycinového pufru, pH 3,0 sa rozpustí 4,5 g génovou technikou vyrobeného ľudského inzulínu (86,2 % proteínového podielu) a potom sa čerpá na stĺpec. K chromatografii proteínu sa dvoma vysokotlakovými čerpadlami vyrobí lineárny gradient z obidvoch pufov A a B. Eluácia sa vykonáva po 100 minútach pri koncentrácii etanolu 33 % a konštantnom toku 80 ml/min. Po frakcionácii a kryštalizácii sa získa v hlavnej frakcii ľudský inzulín s obsahom proteínu 96 % pri celkovom zisku 93 % vzťahujúc na vsadený produkt.

Príklad 10

Pufer A: 0,2 M chlorid amonný, 0,1 M glycín, 0,025 M citran sodný, 10 % metylacetát, pH 5,5

Pufer B: rovnaká koncentrácia solí ako v pufre A, ale 20 % metylacetátu

Sorbens: Kromasil C8, 10 µm, 100 Å vzdialenosť pórov, fma. EKA Nobel, Švédsko

Pre chromatografiu sa 4,6 g surového ľudského inzulínu pochádzajúceho zo spracovania génovou technikou vyrobeného inzulínu rozpustí v 200 ml vodného glycinového pufru a potom sa čerpá na HPLC - stĺpec 50 x 250 mm. Stĺpcový materiál sa predtým vzájomným zmiešaním pufru A a B pomocou dvoch vysokotlakových čerpadiel ekvilibruje na metylacetátovú koncentráciu 13 % metylacetátu. Po podaní sa vykonáva eluácia ľudského inzulínu lineárnym gradientom z 13 % na 17 % metylacetátu počas 90 minút. Izolácia hlavného produktu sa vykonáva kryštalizáciou z elučného roztoku. Pritom sa získa 3,8 g ľudského inzulínu s podielom proteínu 96 %. Celkový zisk, vzťahujúc na východiskový materiál, je pritom 90 %.

Príklad 11

Pufer A: 0,2 M síran amonný, 0,1 M betaín, 0,05 M kyselina citrónová, pH 5,5 s lúhom sodným (čiste vodný)

Pufer B: 0,1 M síran amonný, 0,1 M betaín, 0,05 M kyselina citrónová, pH 5,5 s lúhom sodným (voda/izopropanol v pomere 1:1)

Sorbens: Nucleosil C18, 15 - 25 µm sférický, 100 Å

Stĺpec: 40 mm x 250 mm

Tok: 45 ml/min.

Stĺpec sa pomocou vysokotlakového čerpadla zaťaží 3 g (79 % podiel proteínu) ľudského inzulínu z esterového štiepenia ľudský inzulín-di-terc.butyl-ester/éteru vo forme 3 % roztoku v 0,1 M pufru betaín/HCl, pH 3,0. Potom sa hore menovaným systémom pufov pri 44 % pufru B izokraticky eluuje. Doba retencie je cca 35 minút. Po frakcionácii sa v hlavnej frakcii získa 98,1 % ľudského inzulínu s 80,5 % výťažkom. Celkový zisk je 90,5 %.

Príklad 12

Pufer A: 0,1 M síran amonný, 0,1 M kyselina glutamínová, 0,05 M kyselina citrónová, pH 5,45 s lúhom sodným (čiste vodný)

Pufer B: 0,1 M síran amonný, 0,1 M kyselina glutamínová, 0,05 M kyselina citrónová, pH 5,5 s lúhom sodným (voda/n-propanol v pomere 1:1)

Sorbens: Nucleosil C18-P, 15 - 25 µm sférický, 100 Å

Stĺpec: 50 mm x 250 mm

Tok: 60 ml/min.

Stĺpec sa zaťaží 6 g (73 % podiel proteínu) ľudského inzulínu z esterového štiepenia ľudského inzulín-di-terc.butyl-ester/éteru vo forme 3 % roztoku v 0,1 M kyseline octovej, pH 3,0. Potom sa v gradiente eluuje hore menovaným systémom pufov pri 25% - 28 % pufru B. Doba retencie je cca 25 minút. Po frakcionácii sa v hlavnej frakcii získa 98,6 % ľudského inzulínu so 65 % výťažkom. Celkový zisk je 88,5 %.

Príklad 13

Pufer A: 0,15 M síran amonný, 0,10 M trietylamin, pH 6,5 s kyselinou sírovou (čiste vodný)

Pufer B: 0,08 M síran amonný, 0,05 M trietylamin, pH 6,5 s kyselinou sírovou (voda/2-propanol 1:1)

Sorbens: Nucleosil C18-P, 15 - 25 µm sférický, 100 Å

Stĺpec: 50 mm x 250 mm

Tok: 60 ml/min.

Po zaťažení stĺpca 5 g ľudského inzulínu zo štiepenia kyselinou trifluóroctovou ľudského inzulín-di-terc.butyl- treonín-ester/éter, v 3 % roztoku sa eluuje medzi 32 a 42 % pufru B. Doba retencie je 40 minút. Po frakcionácii a kryštalizácii sa získa 72 % v hlavnej frakcii s čistotou 92,7 %. Celkový zisk je okolo 76 % nasadeného množstva.

Príklad 14

Pufer A: 0,1 M kyselina citrónová, 0,2 M síran amonný, pH 2,5 s kyselinou chlórovodíkovou, čiste vodný

Pufer B: 0,1 M kyselina citrónová, 0,1 M síran amonný, pH 2,5 s kyselinou chlórovodíkovou, voda/n-propanol 1:1

Sorbens: Nucleosil C18, fma. Macherey a Nagel

Stĺpec: 40 x 250 mm

Tok: 45 ml/min.

Po zaťažení stĺpca 3 g ľudského inzulínu zo štiepenia kyselinou trifluóroctovou ľudského inzulín-di-terc.butyl- treonín-ester/éteru vo forme 3 % roztoku v 0,1 M glycinovom pufru pH 3,0 sa eluuje medzi 34 a 35 % pufru B. Doba retencie je 45 minút. Po frakcionácii, kryštalizácii a sušení sa izoluje 57 % vsadeného množstva v hlavnej frakcii s čistotou 94,8 % a 16 % vo vedľajšej frakcii (čistota 84 %).

Príklad 15

Pufer A: 0,1 M kyselina citrónová, 0,2 M síran amonný, pH 3,5 s kyselinou chlórovodíkovou, čiste vodný

Pufer B: 0,1 M kyselina citrónová, 0,1 M síran amonný, pH 3,5 s kyselinou chlórovodíkovou, voda/n-propanol 1:1

Sorbens: Nucleosil C18, fma. Macherey a Nagel

Stĺpec: 40 x 250 mm

Tok: 45 ml/min.

Zaťaženie stĺpca sa vykoná ako v príklade 14. Doba retencie je cca 40 minút. Po frakcionácii, kryštalizácii a sušení sa získa 51 % vsadeného ľudského inzulínu s čistotou 97,5 % v hlavnej frakcii a 4 % vo vedľajšej frakcii (68 % čistoty).

Príklad 16

Pufer A: 0,1 M tris, 0,1 M glycín, 0,1 M chlorid amonný, pH 8,5 s kyselinou chlórovodíkovou, čiste vodný

Pufer B: 0,1 M tris, 0,1 M glycín, 0,1 M chlorid amonný, pH 8,5 s kyselinou chlórovodíkovou, voda/n-propanol 1:1

Sorbens: Kromasil C8, 13 μ m, 100 Å
Stĺpec: 50 mm x 250 mm
Tok: 60 ml/min.

Stĺpec ekvilibrovaný na 33 % pufru B sa zaťaží 6 g ľudského inzulínu zo štiepenia kyselinou trifluóroctovou (pozri príklad 14) vo forme 3 % roztoku v 0,1 M trispufra, pH 8,5. Eluácia sa vykoná cca po 35 minútach. Po frakcionácii a kryštalizácii sa získa hlavná frakcia 96,6 % ľudský inzulín s výťažkom 86 %. Celkový zisk je okolo 95 %.

Príklad 17

Pufer A: 0,1 M chlorid amonný, 0,025 M kyselina citrónová, pH 5,5 s amoniakom, 5 obj. % n-propanol
Pufer B: 0,1 M chlorid amonný, 0,025 M kyselina citrónová, pH 5,5 s amoniakom, 50 obj. % n-propanol
Sorbens: Kromasil C8, 13 μ m, 100 Å
Stĺpec: 50 mm x 250 mm
Tok: 60 ml/min.

Stĺpec sa, ako je už popísané, zaťaží 6 g ľudského inzulínu zo štiepenia kyselinou trifluóroctovou (pozri príklad 14). V priebehu gradientu z 21 % na 25 % pufru B v 60 minútach sa inzulín s dobou retencie 40 minút eluuje. Hlavná frakcia obsahuje 91 % vsadeného produktu s čistotou 97,5 %. Celkový zisk je okolo 96 %.

Príklad 18

Pufer A: 0,1 M chlorid draselný, 0,025 M kyselina citrónová, pH 5,5 s lúhom draselným, 5 obj. % n-propanol
Pufer B: 0,1 M chlorid draselný, 0,025 M kyselina citrónová, pH 5,5 s lúhom draselným, 50 obj. % n-propanol
Sorbens: Kromasil C8, 13 μ m, 100 Å
Stĺpec: 50 mm x 250 mm
Tok: 60 ml/min.

Zaťaženie a gradient ako v príklade 17. Eluácia sa vykonáva po 35 minútach. Hlavná frakcia obsahuje 90 % nasadeného množstva ľudského inzulínu s čistotou 96,5 %. Celkový zisk je okolo 93 %.

Príklad 19 až 24

V príkladoch 19 až 24 sa chromatografia vykoná za rovnakých podmienok ako v príklade 14. Iba pufre, prípadne množstvá, obojakých iónov sa menia.

Príklad 19

Pufer A: 0,15 M síran amonný, 0,1 M trietylamin, pH 7,0 s kyselinou sírovou
Pufer B: 0,08 M síran amonný, 0,05 M trietylamin, pH 7,0 s kyselinou sírovou
Výsledok: 95,2 % čistoty hlavnej frakcie, 67 % výťažku v hlavnej frakcii

Príklad 20

Pufer ako v príklade 16, ale bez 0,1 M glycínu
Výsledok: 96,1 % čistoty v hlavnej frakcii, 65 % výťažku v hlavnej frakcii a 25 % vo vedľajšej frakcii.

Príklad 21

Pufer ako v príklade 15, navyše s 0,1 M glycínu
Výsledok: 96 % čistoty v hlavnej frakcii, 66 % výťažku v hlavnej frakcii a 6 % vo vedľajšej frakcii.

Príklad 22

Pufer A: 0,1 M chlorid amonný, 0,025 M kyselina citrónová, pH 4,5 s amoniakom, 5 obj. % n-propanol, 0,1 M glycinbetain
Pufer B: ako pufer A, ale navyše 50 % n-propanol
Výsledok: 98,1 % čistoty v hlavnej frakcii, 88 % výťažku v hlavnej frakcii a 6 % vo vedľajšej frakcii.

Príklad 23

Pufer ako v príklade 22, ale pH 5,4 a 0,1 M glycínu namiesto glycinbetainu.
Výsledok: 97,9 % čistoty v hlavnej frakcii, 92 % výťažku v hlavnej frakcii a 8 % vo vedľajšej frakcii.

Príklad 24

Pufer ako v príklade 13, ale pH 6,0 a navyše 0,1 M glycínu.
Výsledok: 94,3 % čistoty v hlavnej frakcii, 77 % výťažku v hlavnej frakcii a 13 % vo vedľajšej frakcii.

Príklad 25

V tabuľke 1 je prehľad o výťažkoch a čistote inzulínu v závislosti od hodnoty pH a/alebo obojakých iónov v eluačnom prostriedku.

Tabuľka 1

Hodnota pH	Obojaký ión	Čistota hlavnej frakcie	Výťažky hlavnej frakcie	Výťažky vedľajšej frakcie	Príklad č.
2.5	-	94.8	57	16	14
3.5	-	97.5	51	4	15
6.5	-	92.7	72	4	13
7.0	-	95.2	67	-	19
8.5	-	96.1	65	25	20
5.5	-	97.5	91	5	17
5.5	-	96.5	90	3	18
3.5	Gly	96.0	66	6	21
4.5	Glycinbetain	98.1	88	6	22
5.4	Gly	97.9	92	8	23
5.5	Gly	98.0	93	5	8
6.0	Gly	94.3	77	13	24
8.5	Gly	96.6	86	9	16

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Spôsob čistenia inzulínu a/alebo inzulínových derivátov chromatografiou vo vodných pufrovaných rozpúšťadlách obsahujúcich s vodou miešateľné organické rozpúšťadlá, na lipofilne modifikovanom silikagéli, vyznačujúci sa tým, že pri chromatografii sú v pufrovaných rozpúšťadlách rozpustené obojaké ióny, alebo hodnota pH znesi rozpúšťadiel je v blízkosti izoelektrického bodu čisteného inzulínu alebo derivátu inzulínu a sú prítomné obojaké ióny.

5

10

2. Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že hodnota pH znesi rozpúšťadiel leží až do 1 pH jednotky pod alebo nad izoelektrickým bodom čisteného inzulínu alebo derivátu inzulínu.

15

3. Spôsob podľa nároku 2, vyznačujúci sa tým, že hodnota pH znesi rozpúšťadiel je až do 0,5 pH jednotky pod alebo nad izoelektrickým bodom.

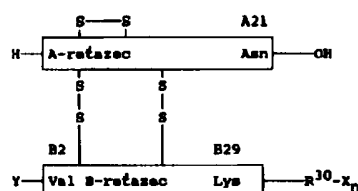
4. Spôsob podľa nárokov 1 až 3, vyznačujúci sa tým, že sa ako obojaké ióny použijú α -aminokyseliny alebo betaíny.

20

5. Spôsob podľa nároku 4, vyznačujúci sa tým, že sa ako obojaký ión použije glycín, kyselina glutamínová alebo glycínbetaín.

25

6. Spôsob podľa nárokov 1 až 5, vyznačujúci sa tým, že sa použijú deriváty inzulínu vzorca I



30

35

v ktorom znamená R^{30} zvyšok geneticky kódovateľnej L-aminokyseliny; X hydroxyskupinu, fyziologicky nezávadnú organickú skupinu bázického charakteru s až 50 atómami uhlíka, geneticky kódovateľnú L-aminokyselinu a jej prípadne prítomná koncová karboxylová funkcia môže byť voľná, ako esterová funkcia, ako amidová funkcia, ako laktón alebo redukovaná na CH_2OH ; n celé číslo 0 až 10; Y vodík alebo L-fenylalanín a A- a B- reťazce sú reťazce zvieracieho alebo ľudského inzulínu.

40

45

7. Spôsob podľa nároku 6, vyznačujúci sa tým, že vo vzorci I R^{30} znamená L-alanín alebo L-treonín a X znamená jednu alebo niekoľko L-aminokyselín zo skupiny L-arginín, L-lyzín alebo L-fenylalanín.

50

8. Spôsob podľa nárokov 1 až 7, vyznačujúci sa tým, že sa použije vysokotlaková kvapalinová chromatografia.

55

Koniec dokumentu