



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

261994

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴
C 07 K 7/40

(22) Přihlášeno 03 02 87
(21) [PV 657-87.K]

(40) Zveřejněno 15 07 88

(45) Vydáno 15 05 89

[75]

Autor vynálezu

KLANČÍK JAROMÍR ing., ČIHÁK ZDENĚK, BARTL VÁCLAV ing. CSc.,
BUCHVALDEK TOMÁŠ ing., HEDRLÍNOVÁ OLGA,
PROCHÁZKA VLADIMÍR RNDr. CSc., BARTA ZDENĚK,
BRAUNSTEINOVÁ MILENA RNDr., PRAHA

(54) Způsob izolace insulinu z vodných roztoků

1

2

Řešení se týká izolace insulinu z přírodního materiálu, z vodných roztoků po odstranění ethanolu a hlavního podílu lipidů. Podstata je v tom, že se vodný koncentrát surového insulinu o minimální koncentraci $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ upraví báží na hodnotu pH 6,9 až 10,5, potom se zvýší měrná vodivost roztoku na hodnotu 50 až 120 mS/cm buď solí alkalického kovu, nebo solí amonnou, nebo přidavkem vysoleného surového insulinu, načež se pevná fáze oddělí, promyje organickým rozpouštědlem nebo směsí organických rozpouštědel mísitelných s vodou. Ze získané pevné fáze se připraví farmaceuticky čistý insulin buď přímo krystalizací v přítomnosti zinečnatých iontů, anebo po předchozím chromatografickém nebo elektrochemickém přečištění. Řešení přináší zvýšení výroby žádaného léku při současné úspoře surovin a energie a zjednodušuje celou izolaci insulinu.

Vynález se týká způsobu izolace insulínu z pankreatu jatečných zvířat.

Výroba insulínu spočívá v desintegraci zmražených žláz, extrakcí vodným okyselem ethanolu, vyčištění extraktu a následném odloučení aniontu kyseliny přítomné při extrakci, spolu s některými balastními látkami organického původu. Potom se ethanol oddestiluje za sníženého tlaku a z vodného odparku se vysolí surový insulin (vysolenina). Do tohoto základního schématu bývají často vkládány další operace s cílem zlepšení zpracovatelnosti meziproductů, snížení ztrát a zvýšení kvality finální substance (např. čs. AO č. 187 784).

Surový vysolený insulin se po rozpuštění zbaví dalších bílkovinných příměsí úpravou pH a filtrací. Z čirého filtrátu se sráží amorfní insulin obvykle v přítomnosti zinečnatých iontů (tzv. Zn-amorfní insulin), často i pomocí přídavku organických s vodou mísitelných rozpouštědel. Z roztoku amorfního Zn-insulínu se postupným srážením při různých hodnotách pH (např. podle čs. pat. č. 131 144) odstraní další průvodní látky bílkovinné povahy, načež je insulin krystalován za přítomnosti zinečnatých iontů.

Takto připravená substance se používá pro výrobu běžných insulinových přípravků. Pro výrobu přípravků o vyšší čistotě se insulin dále čistí např. chromatografií na molekulových sítích (např. čs. AO č. 186 988). Při chromatografickém přečištění by měl mít insulin maximálně 10 % průvodních nečistot, ale nověji bylo zjištěno, že chromatografie probíhá se stejnou účinností i při 40 % znečištění insulínu, v závislosti na povaze průvodních nečistot.

Každou čistící operací však dochází ke ztrátám žádaného produktu a k velké spotřebě rozpouštědel. Nevýhodou většiny známých postupů je nutnost odstraňování krevních barviv v některých stupních izolace adsorpcí na sorbentech s velkým aktivním povrchem (viz čs. AO č. 187 784). Současnými klasickými postupy je insulin průmyslově vyráběn v celosvětovém měřítku od počátku padesátých let. Na více pracovištích byl proto hledán jednodušší a racionálnější postup, avšak zatím bez prakticky použitelného výsledku.

Výjimku činí způsob izolace insulínu podle USA pat. spis. č. 3 719 055, který využívá krystalizace insulínu z bazických roztoků za přítomnosti iontů alkalických kovů nebo iontů amonných. Tento postup je však prakticky obtížně využitelný pro méně čisté meziproducty, jako je například vysolený surový insulin (salt cake) a ve finálních stupních výroby postrádá význam. Příčinou je značná obtížnost nastavení optimální koncentrace iontů, což má za následek špatnou reprodukovatelnost výtěžků i čistoty izolovaného insulínu.

V řadě případů, kdy je jako výchozí materiál používán vysolený surový insulin nebo vodný koncentrát z odparky, vylučuje se

spolu s insulinem značné množství nepolárních látek, pocházejících z pankreatu, které mnohdy činí další zpracování téměř nemožným či značně ztrátovým.

Uvedené nevýhody odstraňuje způsob izolace insulínu z vodných roztoků po odstranění ethanolu podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se vodný koncentrát surového insulínu o minimální koncentraci $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ upraví bázi na hodnotu pH 6,9 až 10,5. Potom se zvýší měrná vodivost roztoku na hodnotu 50 až 120 mS/cm, načež se pevná fáze oddělí, promyje organickým rozpouštědlem nebo směsí organických rozpouštědel mísitelných s vodou a ze získané pevné fáze se připraví farmaceuticky čistý insulin buď přímou krystalizací v přítomnosti zinečnatých iontů, anebo po předchozím chromatografickém nebo elektrochemickém přečištění.

Způsob podle vynálezu se výhodně provádí tak, že se vodný koncentrát surového insulínu upraví přídavkem hydroxidu alkalického kovu nebo hydroxidu amonného na hodnotu pH 7,8 až 8,2.

Měrná vodivost roztoku se zvýší způsobem podle vynálezu na hodnotu 60 až 90 mS/cm přídavkem sodných nebo amonných solí, zejména síranů, chloridů, fosfátů nebo jejich směsí, popřípadě přídavkem vysoleného surového insulínu.

Způsobem podle vynálezu se pevná fáze promývá alkanolem s 1 až 3 atomy uhlíku nebo acetone, případně jejich směsí.

Způsobem podle vynálezu se ze získané pevné fáze připraví čistý insulin.

Způsob podle vynálezu se provádí tak, že se vodný roztok insulínu o koncentraci větší než $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ zbaví hrubě dispergovaných částic, případně se vyčeří zcela, a to filtrací či centrifugací. Potom se podrobí úpravě pH na hodnotu 7,8 až 8,2 pomocí hydroxidu alkalického kovu nebo hydroxidu amonného. Měrná vodivost roztoku se zvýší na hodnotu 60 až 90 mS/cm přídavkem soli alkalického kovu nebo soli amonné, kde aniontem může být síran, fosfát anebo chlorid.

Pro průmyslové využití je výhodné používat při všech úpravách ionty téhož druhu. Pevná fáze obsahující insulin se z roztoku vyloučí zpravidla do 40 hodin. Potom se separuje například tak, že se ponechá 8 až 14 hodin sedimentovat, supernatant se odsaje a sediment se zbaví zbytků matečného louhu vakuovou filtrací na fritě č. 4. Z pevné fáze se odstraní rezidua nepolárních látek opakovanou extrakcí acetone a potom se dosuší promytím etherem. Po rozpuštění a odfiltrování balastních látek nerozpustných při pH 2,0 až 2,8 je insulin krystalizován v přítomnosti zinečnatých iontů buď přímo, anebo po předchozím chromatografickém přečištění.

Způsob podle vynálezu lze s výhodou použít při čištění surového vysoleného insulínu

(vysoleniny) ve finální části výroby. Postup umožňuje rychlou izolaci insulínu z roztoků obsahujících značné množství průvodních látek, jako jsou například krevní barviva, zbytky látek lipidické povahy, aciproteiny, bílkovinné příměsi o molekulové hmotnosti větší než asi 20 000 apod., čímž příměsí zjednodušení, případně vynechání některých předřazených či následných čistících operací.

Způsob podle vynálezu dále umožňuje přípravu insulínu o vyšší čistotě přímo bez izolace krystalického Zn-insulínu před chromatografií. Tím se reprodukovatelně získává již z vysoleného meziproduktu relativně vysocí čistý insulín, v průmyslovém měřítku zpracovatelný na finální substanci s minimálními ztrátami, což se projevuje významným zvýšením výtěžku žádaného produktu při současném snížení nároků na pracnost, zařízení a spotřebu surovin i energií.

Autory vynálezu bylo prokázáno, že postupem podle vynálezu dojde k zvýšení výtěžku insulínu o 4 až 20 %.

Následující příklady provedení způsobu podle vynálezu pouze dokládají, ale neomezuji.

Příklady provedení

Příklad 1

35,9 g vysoleniny, pocházející z 10,0 kg vepřového pankreatu, vysolené pomocí chloridu sodného, bylo rozpuštěno v 100 cm³ destilované vody při pH 6,9 nastaveném pomocí 5 M hydroxidu amonného. Hodnota měrné vodivosti byla upravena přidávkou chloridu sodného na 85 mS/cm a konečná hodnota pH byla nastavena na 7,7. Po třech hodinách míchání při teplotě 16 až 18 °C byla vyloučená pevná fáze odfiltrována, třikrát rozmíchána s celkem 300 cm³ ethanolu, který byl vždy po pěti minutách míchání odsát.

Čistá sraženina byla rozpuštěna v 10,0 cm³ destilované vody při pH 2,1 nastaveném pomocí 1,5 M kyseliny chlorovodíkové a roztok byl podroben gelové filtraci na sloupci 5 × 100 cm polydextranového molekulového síta při eluci 0,01 M kyselinou chlorovodíkovou. Z eluátu byl nejprve vysrážen amorfní insulín 5 % obj. přidávkou, 10 % roztoku octanu zinečnatého a 10 % obj. acetonu při pH 6,4.

Amorfni insulín byl po odstředění rozpuštěn v roztoku 1 g kyseliny citrónové v 60 cm³ destilované vody. Po přidávku 1,6 cm³ 5 % roztoku chloridu zinečnatého a 12 cm³ acetonu byla provedena krystalizace úpravou pH na 5,8 pomocí 5 M hydroxidu amonného. Vyloučený krystalický insulín byl separován filtrací, odvodněn promytím acetonem s etherem a dosušen v exsikátoru nad oxidem fosforečným. Bylo izolováno 1,1370 gramu insulínu o biologické aktivitě 24,89 j/mg.

Příklad 2

Postupem podle příkladu 1 bylo zpracováno 38,2 g vysoleniny pocházející z 10,0 kg vepřového pankreatu a měrná vodivost roztoku byla nastavena na 70 mS/cm přidávkou 14,6 g vysoleniny pocházející z 3,8 kg vepřového pankreatu, přičemž byla průběžně udržována hodnota pH 6,7 až 8,1 pomocí 5 M hydroxidu amonného. Konečná hodnota pH byla nastavena na 8,0. Pevná fáze byla vyloučena po 30 minutách a po rozpuštění a filtraci běžným způsobem zkrystalizována v citrátovém pufru na Zn-krystalický insulín. Bylo izolováno 1,7931 g insulínu o biologické účinnosti 23,92 j/mg.

Příklad 3

50,2 g vysoleniny pocházející z 10 g hovězího pankreatu vysolené síranem amonným z hrubě předčištěného vodného odparku se zbytky balastních látek bílkovinné a lipidické povahy bylo rozpuštěno v 1 000 cm³ demineralizované vody při pH 8,0 upravením pomocí 5 M hydroxidu sodného. Po filtraci byla hodnota měrné vodivosti roztoku upravena přidávkou chloridu sodného na 63 mS/cm. Po 40 hodinách míchání byla vyloučena pevná fáze ponechána 5 hodin sedimentovat, matečný louh byl vakuově odsát, sediment se zbytky matečného louhu byl oddělen na fritě č. 4 a dále zpracován jako v příkladě 1 s tím, že k extrakci balastních látek byl místo ethanolu použit ve stejném objemu aceton. Bylo izolováno 0,9803 g insulínu o biologické aktivitě 26,43 j/mg.

Příklad 4

Stejným postupem jako v příkladě 3 bylo zpracováno 50,2 g vysoleniny a hodnota měrné vodivosti roztoku 90 mS/cm byla nastavena pomocí síranu sodného. Bylo izolováno 0,9956 g insulínu o biologické aktivitě 25,04 j/mg.

Příklad 5

Podle příkladu 3 bylo zpracováno 50,2 g vysoleniny a hodnota měrné vodivosti roztoku 100 mS/cm byla nastavena pomocí síranu amonného. Bylo izolováno 0,9495 g insulínu o biologické aktivitě 25,51 j/mg.

Příklad 6

32,1 g vysoleniny pocházející ze směsi 7 kg vepřového a 3 kg hovězího pankreatu, vysolené chloridem sodným bylo rozpuštěno 1 500 cm³ destilované vody při pH 2,3 nastaveném přidávkou kyseliny octové. Po filtraci byla nastavena hodnota pH 7,9 pomocí 5 M hydroxidu sodného a měrná vodivost roztoku 75 mS/cm pomocí chloridu sod-

ného. Po 60 hod. míchání byla vyloučená pevná fáze ponechána sedimentovat 5 hodin. Sediment byl zbaven zbytků kapalné fáze filtrací na fritě č. 4 a přečištěn promytím $3 \times 150 \text{ cm}^3$ methanolu. Po dosušení etherem a v exsikátoru nad oxidem fosforečným zpracován dále jako v příkladě 1. Bylo izolováno 1,1023 g insulínu o biologické účinnosti 25,51 j/mg.

Příklad 7

Podle postupu v příkladě 6 bylo zpracováno 32,1 g vysoleniny a při jejím rozpouštění bylo nastaveno pH 2,2 pomocí 1 M kyseliny sírové, měrná vodivost 58 mS/cm byla upravena přidavkem síranu amonného a k extrakci balastních látek ze sedimentu bylo použito 220 cm^3 ethanolu. Bylo izolováno 1,0177 g insulínu o biologické účinnosti 24,83 j/mg.

Příklad 8

Podle postupu v příkladě 6 bylo zpracováno 32,1 g vysoleniny a při jejím rozpouštění bylo nastaveno pH 2,7 pomocí 1,5 M

kyseliny chlorovodíkové a hodnota měrné vodivosti 95 mS/cm pomocí síranu sodného. Konečná hodnota pH 8,5 byla nastavena pomocí hydroxidu draselného a pevná fáze byla oddělena centrifugací. Bylo izolováno 1,0027 g insulínu o účinnosti 23,94 j/mg.

Příklad 9

Bylo zpracováno 5,0 l vodného filtrovaného odparku o pH 2,3 pocházejících z 10,0 vepřového pankreatu. Pomocí 5 M hydroxidu sodného byla upravena hodnota pH 8,1 a hodnota měrné vodivosti 88 mS/cm byla upravena přidavkem chloridu sodného. Po 120 hodinách byla pevná fáze ponechána 5 hodin sedimentovat. Asi 9/10 kapalné fáze nad sedimentem bylo odtazeno a pevná fáze byla dosušena filtrací na fritě, promývána $5 \times 200 \text{ cm}^3$ acetonem, dosušena etherem a po rozpouštění a filtraci podrobena gelové filtraci na sloupci polydextranového gelu a potom byl insulin běžným způsobem zkrystalizován v přítomnosti zinečnatých iontů. Bylo izolováno 0,8394 g insulínu v aktivitě 24,01 j/mg.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob izolace insulínu z vodných roztoků po odstranění ethanolu a většiny vyloučených lipidů, vyznačující se tím, že se vodný koncentrát surového insulínu o minimální koncentraci $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ upraví bází na hodnotu pH 6,9 až 10,5, potom se zvýší měrná vodivost na hodnotu 50 až 120 mS/cm, načež se pevná fáze oddělí, promyje organickým rozpouštědlem nebo směsí organických rozpouštědel mísitelných s vodou a ze získané pevné fáze se připraví farmaceuticky čistý insulin buď přímou krystalizací v přítomnosti zinečnatých iontů, anebo po předchozím chromatografickém nebo elektrochemickém přečištění.

2. Způsob podle bodu 1 vyznačující se

tím, že se vodný koncentrát surového insulínu upraví přidavkem hydroxidu alkalického kovu nebo hydroxidu amonného na hodnotu pH 6,9 až 10,5, s výhodou na hodnotu pH 7,8 až 8,2.

3. Způsob podle bodu 1 vyznačující se tím, že měrná vodivost se zvýší přidavkem sodných, draselných nebo amonných solí, zejména síranů, chloridů, fosfátů nebo jejich směsí, popřípadě přidavkem vysoleného surového insulínu na hodnotu 50 až 120 mS/cm, s výhodou na hodnotu 60 až 90 mS/cm.

4. Způsob podle bodu 1 vyznačující se tím, že se pevná fáze opakovaně promývá alkanolem s 1 až 3 atomy uhlíku nebo acetonem, případně jejich směsí.