



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 10.11.76 (P. 193628)

Pierwszeństwo _____

Zgłoszenie ogłoszono: 22.05.78

Opis patentowy opublikowano: 31.08.1979

CZYTELNIA

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Int. Cl.² A61K 37/26

Twórcy wynalazku: Kazimierz Dziegielewski, Halina Figurska, Leszek Drogowski, Wilhelmina Cholewka, Jan Dworczyk

Uprawniony z patentu: Tarchomińskie Zakłady Farmaceutyczne „Polfa”,
Warszawa (Polska)

Sposób oczyszczania insuliny

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób oczyszczania insuliny, pochodzącej ze zwierzęcych gruczołów trzustkowych.

Znane są liczne metody oczyszczania insuliny, polegające na jedno lub wielokrotnym wysalaniu insuliny z jej roztworów, wytrącaniu w punkcie izoelektrycznym, sorpcji na żywicach jonowymiennych lub krystalizacji połączenia cynkowego insuliny, przy czym w procesie oczyszczania zazwyczaj stosuje się kilka z tych metod w różnej kolejności.

Handlowe preparaty insuliny, wytwarzane przy zastosowaniu wyżej wymienionych metod oczyszczania, zawierają przeciętnie około 10% zanieczyszczeń organicznych, które wywołują u pacjentów niekorzystne objawy uboczne, takie jak odczyny alergiczne i powstawanie przeciwciał.

Przedmiotem wynalazku jest sposób oczyszczania insuliny metodą ekstrakcji do rozpuszczalnika organicznego, nie stosowaną dotychczas w tej dziedzinie.

Sposób według wynalazku polega na tym, że zanieczyszczony roztwór insuliny poddaje się wstępnemu oczyszczeniu przez ekstrakcję insuliny do alkoholu alifatycznego o 3 — 4 atomach węgla w cząsteczce przy wartości pH nie większej od 6, korzystnie przy wartości pH = 1,5 — 3,5, i w obecności rozpuszczalnej w wodzie soli nieorganicznej. Z otrzymanego roztworu alkoholowego insulinę reekstrahuje się do fazy wodnej przy wartości pH = 6 — 10, korzystnie 7 — 9, lub wytrąca za pomocą acetonu i rozpuszcza w wodzie wytrącony osad. Jako rozpuszczalną w wodzie sól nieorganiczną korzystnie stosuje się chlorek sodowy, zwłaszcza w ilości 5—25% wagowych w stosunku do ilości wyjściowego roztworu insuliny.

2

Jako wyjściowy wodny roztwór insuliny stosuje się zazwyczaj roztwór, otrzymany po zagęszczeniu kwaśnego, surowego ekstraktu wodnoetanolowego insuliny i oddzieleniu substancji tłuszczowych, lecz można również stosować częściowo oczyszczone roztwory insuliny, na przykład roztwór, otrzymany przez rozpuszczenie w wodzie ciasta solnego po wysoleniu insuliny lub eluat z żywicy jonowymiennych.

Alkohol alifatyczny, na przykład propanole lub butanole, stosuje się w ilości około 10 — 100% objętościowych w stosunku do wodnego roztworu insuliny. Proces ekstrakcji prowadzi się zazwyczaj w temperaturze pokojowej. W takich warunkach do fazy alkoholowej przechodzi około 95% insuliny, znajdującej się w roztworze wodnym, natomiast większość zanieczyszczeń pozostaje w wyjściowym roztworze wodnym.

Reekstrakcję insuliny do fazy wodnej prowadzi się korzystnie w obecności buforu, zwłaszcza buforu fosforanowego, zawierającego jony sodowe i w temperaturze pokojowej lub nieco obniżonej (około +5°C — +25°C).

Jeśli do ekstrakcji stosuje się alkohol alifatyczny, mieszający się z wodą nieograniczenie, na przykład propanol, to wtedy z otrzymanego po ekstrakcji roztworu alkoholowego wytrąca się insulinę nadmiarem acetonu (100 — 300% objętościowych acetonu w stosunku do roztworu alkoholowego). Otrzymany osad insuliny rozpuszcza się w wodzie, otrzymując oczyszczony roztwór.

Z otrzymanego oczyszczonego roztworu insulinę wysala się za pomocą chlorku sodowego przy wartości pH = 7,7 — 8,3, przy czym korzystnie stosuje się 3 — 12%

wagowych chlorku sodowego w stosunku do roztworu insuliny.

Z wytrąconego osadu oczyszczonej insuliny otrzymuje się połączenie cynkowe insuliny znanymi metodami. W tym celu osad oddziela się, rozpuszcza w 2%-wym roztworze kwasu cytrynowego i prowadzi się krystalizację przy wartości pH = 5,8 — 6,8 w obecności kationu cynkowego, stosowanego w ilości 0,033 g/g insuliny, znajdującej się w roztworze i w obecności acetonu, stosowanego w ilości 15% objętościowych w stosunku do wyjściowego roztworu insuliny.

Preparaty insuliny, otrzymane przy użyciu ekstrakcyjnej metody oczyszczania, wykazują bardzo małą zawartość organicznych zanieczyszczeń wielkocząsteczkowych (2 — 5%) i posiadają wysoką aktywność biologiczną (24,5 — 26,5 j.m/mg).

Sposób według wynalazku jest objaśniony następującymi przykładami:

Przykład I. Do 3000 ml wodnego roztworu insuliny (pH = 2,9, sucha masa 75 mg/ml, zawartość insuliny 0,2 mg/ml), otrzymanego po oddzieleniu etanolu i tłuszczów z wodnoetanolowego ekstraktu trzustki, dodaje się przy energicznym mieszaniu 1500 ml n-propanolu, 10 ml 10% HCl i 600 g NaCl. Po 1 godzinie rozdziela się fazy na szybkoobrotowej wirówce. W fazie n-propanolowej (1440 ml) znajduje się 96% insuliny, zawartej w wyjściowym roztworze. Otrzymany ekstrakt n-propanolowy zagęszcza się pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 800 ml i wytrąca się surową insulinę 2 objętościami acetonu przy pH = 6,0. Osad odsacza się, przemywa acetonem i suszy. Zawiera on 85% wyjściowej ilości insuliny.

Przykład II. Do 3000 ml wodnego roztworu insuliny (otrzymanego, jak w przykładzie I) dodaje się przy energicznym mieszaniu 1000 ml n-butanolu, 20 ml 10% roztworu HCl i 750 g NaCl. Po 30 minutach rozdziela się fazy na wirówce, roztwór wodny ekstrahuje się powtórnie 300 ml n-butanolu i rozdziela fazy. Do połączonych ekstraktów butanolowych (1320 ml) dodaje się 400 ml wody destylowanej i przy mieszaniu koryguje się pH do wartości 7,85 10% NaOH, a po 45 minutach rozdziela się fazy. Do warstwy wodnej (370 ml, sucha masa 16 mg/ml, 85% wyjściowej ilości insuliny), nie zawierającej alkoholu n-butyloвого, dodaje się 48 g NaCl, po wymieszaniu pozostawia się na 4 godziny, krystaliczny osad insuliny odwirowuje się, przemywa mieszaniną aceton — woda 1:3 (v/v) i suszy. Otrzymana substancja o aktywności 22 j/mg zawiera 80% insuliny, zawartej w wyjściowym roztworze.

Przykład III. 100 l zagęszczonego ekstraktu z trzustki bydłowej, nie zawierającego alkoholu etylowego i tłuszczów,

o zawartości insuliny 0,25 mg/ml, ekstrahuje się 20 l alkoholu n-butyłowego w obecności 20 kg NaCl przy wartości pH = 2,45.

Ekstrakcję prowadzi się w reaktorze przez 30 minut przy szybkim mieszaniu (2880 obr./min.), a następnie rozdziela się fazy na ultrawirówce (18000 obr./min.). Fazę organiczną (19,5 l) ekstrahuje się 5 litrami 0,1 N buforu fosforanowego przy pH = 7,8 przez 20 minut i rozdziela się fazy. Do fazy wodnej (5,25 l), nie zawierającej alkoholu n-butyłowego, dodaje się 700 g NaCl, miesza przez 6 godzin w temperaturze +20°C i oddziela osad insuliny na wirówce. Insulinę rozpuszcza się w 1 l 2% roztworu kwasu cytrynowego, podnosi się pH do wartości 8,1, usuwa osad, a do klarownego roztworu dodaje się 11,5 ml 10% roztworu ZnCl₂, 150 ml acetonu i obniża się pH roztworu 10%-owym HCl do wartości 6,65. Po pojawieniu się kryształów insuliny chłodzi się roztwór do temperatury +18°C, a następnie utrzymując w tej temperaturze, obniża się pH 10%-wym HCl do wartości 5,9 w ciągu 24 godzin. Krystaliczny roztwór insuliny oddziela się na wirówce przemywa acetonem, eterem i suszy w temperaturze +35°C. Otrzymuje się 16,75 g insuliny o aktywności biologicznej 25,5 j/mg (wydajność 67%).

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób oczyszczania insuliny, w którym zanieczyszczony roztwór insuliny poddaje się wstępnemu oczyszczaniu, a następnie insulinę wysala się z oczyszczonego roztworu i krystalizuje z buforu cytrynianowego w obecności kationów cynkowych, **znamienny tym**, że wstępne oczyszczanie zanieczyszczanego roztworu prowadzi się przez ekstrakcję insuliny do alkoholu alifatycznego o 3 — 4 atomach węgla w cząsteczce przy wartości pH nie większej od 6, korzystnie przy wartości pH = 1,5 — 3,5, i w obecności rozpuszczalnej w wodzie soli nieorganicznej, a następnie reekstrakcję z fazy alkoholowej do fazy wodnej przy wartości pH = 6 — 10, korzystnie 7 — 9, lub wytrącenie z fazy alkoholowej za pomocą acetonu i rozpuszczenie w wodzie.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako rozpuszczalną w wodzie sól nieorganiczną stosuje się chlorek sodowy w ilości 5 — 25% wagowych w stosunku do ilości wyjściowego zanieczyszczanego roztworu insuliny.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że reekstrakcję insuliny z fazy alkoholowej do fazy wodnej prowadzi się w obecności buforu, korzystnie buforu fosforanowego, zawierającego jony sodowe.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że insulinę wysala się przy wartości pH = 7,7 — 8,3.