



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 24.03.81 (P. 230292)

Pierwszeństwo: 27.03.80 dla zastrz. 1—11
28.11.80 dla zastrz. 12—23
Stany Zjednoczone Ameryki

Zgłoszenie ogłoszono: 27.11.81

Opis patentowy opublikowano: 20.11.1985



Int. Cl.³ C07C 103/52

Twórca wynalazku _____

Uprawniony z patentu: Eli Lilly and Company, Indianapolis (Stany
Zjednoczone Ameryki)

Sposób wytwarzania prekursora insuliny

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania prekursora insuliny.

W ciągu ostatnich kilku lat dokonano różnorodnych prób syntetycznego lub półsyntetycznego wytwarzania insuliny. Insulina jest cząsteczką o dwóch łańcuchach peptydowych, łańcuchu A zawierającym 21 reszt aminokwasowych i łańcuchu B zawierającym 30 reszt aminokwasowych. Łańcuchy te zawierają trzy mostki dwusiarczkowe, z których każdy tworzą dwie reszty cysteinowe. Dwa mostki dwusiarczkowe łączą łańcuch A z łańcuchem B. Mostki tworzą odpowiednie reszty przy A-6 i A-11, i A-7 i B-7 oraz A-20 i B-19.

Jedna ze znanych metod wytwarzania insuliny prowadzi przez cząsteczkę proinsuliny lub typu proinsuliny. Proinsulina jest pojedynczym łańcuchem polipeptydowym, w którym N-końcowa łańcucha A insuliny wiąże się peptydem wiążącym z C-końcową grupą łańcucha B insuliny, przy czym wiązania dwusiarczkowe łączą odpowiednie reszty cysteinowe. Np. proinsulina ludzka ma 86 reszt aminokwasowych, z których 35 tworzy peptyd wiążący. Yanaihara i inni w Diabetes 27 (Suppl. 1) 149—160 (1978) ujawniają syntezę różnych peptydów łączących i proinsuliny ludzkiej.

W literaturze ujawniono inne cząsteczki typu proinsuliny, przy czym główną różnicą w stosunku do proinsuliny jest budowa ugrupowania łączącego łańcuchy A i B oraz miejsce tego połączenia.

2

Tak więc Busse i inni w Biochemistry 15, nr 8, 1649—1657 (1976) opisują połączenie zawierające dwie reszty metionylowe połączone ich N-końcowymi grupami poprzez grupę karbonylową, przy czym ostateczne ugrupowanie łączy się z N-końcową grupą glicynową A-1 i N-końcową grupą lizynową B-29.

Podobnie opisano inne ugrupowanie łączące (patrz np. Geiger i inni. Biochem. i Biophys. Res. Comm. 55, 60—66 (1973), Brandenburg i inni, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. b.d. 354, 613—627 (1973), opisy patentowe St. Zjedn. Am. nr 3847893, 3907763, 3883496, 3883500 i 3884897).

W każdym z powyższych sposobów wytwarzania insuliny prowadzących przez pojedynczy łańcuch zawierający łańcuchy A i B połączone określonym ugrupowaniem, bezpośrednie połączenie wewnętrzne należy prowadzić poprzez utworzenie trzech mostków dwusiarczkowych z sześciu reszt cysteinowych obecnych w łańcuchach A i B. Po utworzeniu wiązania dwusiarczkowego usuwa się oryginalne ugrupowanie łączące, wytwarzając insulinę.

W celu zastosowania tego sposobu do wytwarzania insuliny bardzo pożądanym jest skuteczny i łatwy sposób wytwarzania prawidłowego mostka dwusiarczkowego. Na ogół znane sposoby wytwarzania mostka dwusiarczkowego polegają na utlenianiu na powietrzu odpowiedniej grupy -SH. Ponadto, ponieważ stwierdzono, że grupa -SH jest nietrwała, zwykle wytwarza się prekursor z grupą

zabezpieczającą, najczęściej ugrupowaniem S-sulfonianowym (-SSO₃-). Tak więc sposoby literaturowe wymagają dwóch etapów, to znaczy redukcji S-sulfonianu do grupy -SH poprzez działanie merkaptanu a następnie utleniania na powietrzu utworzonego związku -SH.

Jedyny wyjątek znany w stanie techniki w stosunku do ogólnego dwuetapowego sposobu, który zastosowano jednakże do połączenia łańcuchów A i B insuliny, a nie do wytworzenia dwusiarczku z S-sulfonianowego łańcucha prekursora insuliny o liniowym łańcuchu, opisuje Dixon i inni w *Nature* 188, 721—724 (1960), przy czym sposób ten prawdopodobnie zakłada wytworzenie insuliny poprzez połączenie S-sulfonianów łańcuchów A i B w jednym roztworze. Szczegóły tego znanego sposobu podano w sposób zupełnie szkicowy a wydajność określona na podstawie czynności odzyskanego produktu wynosi jedynie 1—2%. Późniejsza publikacja (Dixon, *Proc. Intern. Congr. Endocrinol.* 2nd Londyn 1964, 1207—1215 (1965) wydaje się nieco wyjaśniać szczegóły tego sposobu, sugerując w Tablicy IV, strona 1211 dwuetapowy sposób wymagający beztlenowej redukcji S-sulfonianu a następnie utleniania do dwusiarczku.

Zgodnie z wynalazkiem wytwarza się prekursor insuliny o wzorze 1, w którym R oznacza atom wodoru, Y oznacza grupę o wzorze 2, w którym Z oznacza Ala lub Thr, ugrupowania od A-1 do A-21 są insulिनowym łańcuchem A insuliny ludzkiej, bydlęcej lub świńskiej, ugrupowania od B-1 do B-30 są insulिनowym łańcuchem B insuliny ludzkiej, bydlęcej lub świńskiej, a X oznacza ugrupowanie, które łączy się z łańcuchem A insuliny przy aminowej grupie A-1 i z łańcuchem B insuliny przy ε-aminowej grupie B-29 lub karboksylowej grupie B-30, przy czym ugrupowanie to można chemicznie lub enzymatycznie odścisnąć od obu łańcuchów A i B bez ich rozzerwania, przy czym sposób według wynalazku polega na tym, że S-sulfonian o wzorze 3, w którym R, X i Y mają wyżej podane znaczenie, poddaje się reakcji z merkaptanem.

Cechą sposobu według wynalazku jest to, że merkaptan stosuje się w ilości dostarczającej około 1—5 grup -SH na każdą grupę -SSO₃⁻, w roztworze wodnym o pH około 7—11,5, przy stężeniu S-sulfonianu do około 10 mg/ml środowiska wodnego, w temperaturze około 0—37°C, przy czym sposób realizuje się jednoetapowo, w środowisku zasadniczo wolnym od środka utleniającego.

Użyte określenie „prekursor insuliny” odnosi się do cząsteczki, która zawiera łańcuch A insuliny i łańcuch B insuliny, ma co najmniej trzy wiązania dwusiarczkowe będące połączeniem atomów siarki każdej z grup Cys obecnej w łańcuchach A i B w położeniach odpowiednio A-6 i A-11, A-7 i B-7 oraz A-20 i B-19, oraz ma możliwą do usunięcia grupę łączącą przyłączoną do łańcucha A insuliny przy aminowej grupie A-1 i do łańcucha B insuliny przy ε-aminowej grupie reszty lizynowej B-29 karboksylowej grupie aminokwasu B-30.

Grupa Z, która określa resztę aminokwasową B-30 insuliny jest jedną z reszt Ala lub Thr. Reszty te reprezentują naturalnie występujące insuliny,

przy czym Thr występuje w insulinie ludzkiej, a Ala w insulinie bydlęcej i świńskiej.

Ugrupowanie łączące X prekursora insuliny i S-sulfonianu prekursora insuliny o liniowym łańcuchu może pochodzić z wielu różnych związków. Korzystnie ugrupowanie X jest polipeptydem. Polipeptyd zwykle zawiera co najmniej 2, a korzystnie 2—35, a najkorzystnie około 6—35 reszt aminokwasowych. Ugrupowanie X łączy się z łańcuchem A przy grupie aminowej A-1, a z łańcuchem B przy grupie hydroksylowej B-30. Najkorzystnie ugrupowanie łączące X, jeżeli jest peptydem, jest naturalnym peptydem łączącym prekursora insuliny i zwykle tej insuliny, którą reprezentuje jeden lub oba łańcuchy A i B, z którymi się łączy. Przykładami naturalnie występujących peptydów łączących są następujące peptydy:

Króliczy: -Arg-Arg-Glu - Val - Glu - Glu - Leu-Gln-Val-Gly-Gln-Ala-Glu-Leu - Gly-Gly-Gly - Pro-Gly-Ala-Gly-Gly-Leu-Gln-Pro-Ser-Ala-Leu-Glu-Ala - Leu-Gln-Lys-Arg-.

Ludzki: -Arg-Arg-Glu - Ala - Glu - Asp - Leu-Gln-Val-Gly-Gln-Val-Glu-Leu - Gly-Gly-Gly-Pro-Gly - Ala-Gly-Ser - Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly - Ser-Leu-Gln-Lys-Arg-.

Małpi: -Arg-Arg-Glu - Ala - Glu - Asp - Pro-Gln-Val-Gly-Gln-Val-Glu-Leu - Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser - Leu-Gln - Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-Lys-Arg-.

Koński: -Arg-Arg-Glu - Ala - Glu - Asp - Pro-Gln-Val-Gly - Glu-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Leu - Gly-Gly-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Ala - Gly-Pro-Gln-Gln-Lys-Arg-.

Szczurzy I: -Arg-Arg-Glu - Val - Glu - Asp - Pro-Gln-Val-Pro-Gln-Leu-Glu - Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Glu-Ala - Gly-Asp-Leu-Gln-Thr-Leu-Ala - Leu-Glu-Val-Ala-Arg-Gln-Lys-Arg-.

Szczurzy II: -Arg - Arg - Glu - Val - Glu-Asp-Pro-Gln - Val-Ala-Gln-Leu-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala - Gly-Asp-Leu-Gln-Thr-Leu-Ala-Leu - Glu-Val-Ala-Arg-Gln-Lys-Arg-.

Wieprzowy: -Arg - Arg - Glu - Ala - Glu-Asn-Pro-Gln-Ala-Gly-Ala-Val - Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Leu-Gly-Gly-Leu - Gln-Ala-Leu - Ala-Leu-Glu-Gly-Pro-Pro-Gln-Lys-Arg-.

Bydlęcy -Arg - Arg - Glu - Val - Glu-Gly-Pro-Gln-Val-Gly-.

Barani: Ala-Leu-Glu-Leu-Ala-Gly - Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Gly-Leu-Glu - Gly-Pro-Gln-Lys-Arg-.

Psi: -Arg - Arg - Asp - Val - Glu-Leu-Ala-Gly-Ala-Pro-Gly-Glu-Gly - Gly-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu - Gly-Ala-Leu-Gln-Lys-Arg-.

Świnki morskiej: -Arg-Arg-Glu - Leu - Glu - Asp - Pro-Gln-Val-Glu-Gln-Thr - Glu-Leu-Gly-Met-Gly-Leu-Gly-Ala-Gly-Gly-Leu-Gln-Pro-Leu-Gln-Gly-Ala-Leu - Gln-Lys-Arg-.

Szynszyli: -Arg-Arg - Asp-Val - Glu - Gln - Pro-Leu-Val-Asn-Gly-Pro-Leu - His-Gly-Glu-Val-Gly-Glu-Leu-Pro -Phe-Gln-His-Glu-Glu-Tyr-Gln-Lys-Arg-.

Bardzo korzystne jest jeżeli sekwencje aminokwasów A-1 do A-21, X i B-1 do B-30 są naturalnie występującymi sekwencjami łańcucha A, peptydu łączącego i łańcucha B proinsuliny wieprzowej, bydlęcej lub ludzkiej, a najkorzystniej proinsuliny ludzkiej.

Jakkolwiek, jak stwierdzono wyżej, korzystnie stosuje się naturalną sekwencję łączącą, jako peptydu łączącego można również stosować dużo krótsze sekwencje peptydowe. Jedynymi wymaganiami są odpowiednia długość pozwalająca na właściwą utworzenie wiązania dwusiarczkowego pomiędzy łańcuchami A i B oraz ich zdolność do odszczepiania od prekursora, powodująca wytworzenie insuliny. Typowym dwupeptydem możliwym do stosowania jest -Arg-Arg-. Ponadto można stosować modyfikację wyżej wspomnianego dwupeptydu o wzorze -Arg-X-Arg-, w którym X oznacza co najmniej jedną resztę aminokwasową. Bardzo korzystnymi peptydami łączącymi są -Arg-Arg-Lys-Arg-, a także długi łańcuch peptydowy o budowie -Arg-Arg-X²-Lys-Arg-, w którym X² oznacza co najmniej jedną resztę aminokwasową, a korzystnie dwie reszty aminokwasowe. Oczywiście do tego ostatniego rodzaju należą naturalne peptydy łączące, z których wiele omówiono wyżej.

Tak więc uwzględniając powyższe kryteria, można stosować dowolne ugrupowanie łączące. W tych przypadkach, w których ugrupowaniem łączącym jest polipeptyd, punktami połączenia jest aminowa zakończenie łańcucha A (A-1) i karboksylowe zakończenie łańcucha B. (B-30). Ponieważ jednak reszta aminokwasowa B-29 (Lys) zawiera grupę E-aminową, ugrupowanie łączące można przyłączyć do łańcuchów A i B poprzez grupy aminowe A-1 i B-29. Tak więc np. grupa karbonylobis (metionylowa), którą opisują Busse i inni w cytowanej powyżej pracy, grupa 2,2-sulfonylobis(etoksykarbonylowa), którą opisują Obermeier i inni w Hoppe-Sayler'a Z. Physiol. Chem. 356, 1631—1634 (1975), grupa 2,7-dwuaminosulberoilowa, którą opisują Geiger i inni, w cytowanej pracy itp. są użytecznymi ugrupowaniami łączącymi ostatniego rodzaju.

Realizując sposób według wynalazku, S-sulfonian prekursora insuliny o liniowym łańcuchu poddaje się działaniu merkaptanu w środowisku wodnym o odczynie pH około 7—11,5. Przez merkaptan rozumie się związek zawierający co najmniej jedną grupę -SH. Jedynym ograniczeniem dla merkaptanu, który stosuje się w sposobie według wynalazku jest to, że musi on być rozpuszczalny w wodzie.

Przykładami typowych merkaptanów rozpuszczalnych w wodzie są dwutiotreitol, dwutioerytryt, 2-merkaptotetanol, tioglikolan metylu, 3-merkaptol-1,2-propanodiol, kwas-3-merkaptopropionowy i podobne. Jakkolwiek można stosować merkaptany zawierające kilka grup -SH, takie jak dwutiotreitol, korzystnie stosuje się merkaptan zawierający jedną grupę -SH. Z merkaptanów tych bardzo korzystny jest 2-merkaptotetanol.

Sposób według wynalazku realizuje się w środowisku wodnym, w którym utrzymuje się wymagana wartość pH zwykle dodając odpowiedniego środka buforującego. Odczyn środowiska odpowiada wartości pH około 7—11,5. Jednak korzystnie wartość pH wynosi około 9,5—10,5. W sposobie według wynalazku można stosować każdy środek buforujący wykazujący pojemność buforową w wyżej wymienionych granicach. Przykładami odpowiednich środków buforujących są bufony fosforanowe, trójhidroksymetyloaminometan (Tris), bufony boranowe, glicynowe, itp.

Stężenie środka buforującego w środowisku wodnym wynosi zwykle do około 0,5n. Korzystnie stężenie wynosi około 0,005—0,5n, a najkorzystniej około 0,005—0,1n.

S-sulfonian prekursora insuliny o liniowym łańcuchu wprowadza się do środowiska wodnego w stężeniu nie większym niż około 10 mg/ml. Korzystnie stosuje się stężenie niższe, zwykle około 0,05—2 mg/ml.

Ważnym elementem sposobu według wynalazku jest ilość użytego merkaptanu w stosunku do S-sulfonianu prekursora insuliny o liniowym łańcuchu. W znanych w stanie techniki sposobach redukcji S-sulfonianu do -SH stosowano bardzo duży nadmiar merkaptanu w stosunku do S-sulfonianu. Obecnie jest oczywiste, że taki duży nadmiar niszczy S-sulfonianową substancję wyjściową, w wyniku czego uzyskuje się całkowitą redukcję S-sulfonianu do odpowiedniego związku -SH. To z kolei powoduje konieczność wyodrębnienia związku przejściowego -SH lub rozcieńczenia mieszaniny reakcyjnej, a następnie stosowania odrębnego etapu utleniania, zwykle przy użyciu powietrza, w celu przemiany związku przejściowego -SH w wymagany związek -S-S- (patrz np. Crestfield i inni, J. Biol. Chem. 238, 622—627 (1963), Steiner i inni, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 60, 622—629 (1968) i Yanaihara i inni, Diabetes 27 (Suppl. 1), 149—160 (1978)).

Z drugiej strony sposób według wynalazku wymaga użycia merkaptanu w ilości, która dostarcza około 1—5 grup -SH na każdą grupę -S-SO₃⁻, a korzystnie ilości, która dostarcza około 2—4 grup -SH na grupę -SSO₃⁻. Stwierdzono, że jeżeli używa się merkaptanu w wyżej wymienionej ilości, możliwa jest z dużą wydajnością i łatwością przemiana S-sulfonianu prekursora insuliny o liniowym łańcuchu bezpośrednio w żądany dwusiarczkowy prekursor insuliny. Ponieważ insulinowe łańcuchy A i B obecne jako część S-sulfonianu zawierają sześć grup S-sulfonianowych, w celu osiągnięcia wyżej podanej ilości grup -SH w stosunku do grup -SSO₃⁻, merkaptanu zawierającego pojedynczą grupę -SH oczywiście użyje się w stosunku molowym od około 6 : 1 do około 30 : 1.

Współzależność pH, siły jonowej roztworu buforowego i stężenia S-sulfonianu prekursora insuliny o liniowym łańcuchu jest ważnym, jakkolwiek nie zasadniczym, warunkiem realizacji sposobu według wynalazku. Tak więc na ogół korzystnie stosuje się roztwór buforowy o wyższym pH i niższej sile jonowej a także niższe stężenie S-sulfonianu prekursora insuliny o liniowym łańcuchu.

Ponadto w odróżnieniu od typowych sposobów znanych w stanie techniki, nie ma zasadniczego znaczenia prowadzenie procesu według wynalazku w środowisku utleniającym. Jakkolwiek środek utleniający, np. powietrze, może być obecny w środowisku reakcji, nieoczekiwanie stwierdzono, że bardzo korzystnie prowadzi się reakcję przy zasadniczym braku powietrza lub innego środka utleniającego. Przez określenie „zasadniczy brak” rozumie się pominięcie celowego dodawania powietrza. Osiąga się to prowadząc reakcję w układzie zamkniętym, który wyklucza dostęp powietrza lub innego środka utleniającego. W celu dalszego zapewnienia braku dostępu powietrza, środowisko wodne można przedmuchać azotem i odgazować przed dodaniem reagentów.

Inną bardzo pożądaną, jakkolwiek nie zasadniczą, cechą sposobu według wynalazku jest kontrola temperatury. Proces prowadzi się zwykle w temperaturze około 0–37°C. Korzystnie stosuje się temperaturę bliższą 0°C, zwykle temperaturę około 2–8°C, a jeszcze korzystniej temperaturę 4–6°C. Jednakże jeszcze korzystniej proces prowadzi się w dwóch przedziałach temperaturowych. Mieszaninę reakcyjną przygotowuje się w temperaturze pokojowej i po przygotowaniu oziębia się do temperatury około 2–8°C i utrzymuje w tej temperaturze w ciągu pozostałego czasu reakcji.

Dlatego zwykle realizując sposób według wynalazku przygotowuje się środowisko wodne o wybranym odczynie pH stosując np. glicynę o stężeniu około 0,05n. Tak przygotowane środowisko wodne, które utrzymuje się zwykle w temperaturze około 0–37°C, a korzystnie w temperaturze pokojowej, odgazowuje się, przedmucha azotem i ponownie odgazowuje. W środowisku wodnym rozpuszcza się S-sulfonian prekursora insuliny o liniowym łańcuchu w ilości odpowiadającej wymaganiu stężeniu np. około 0,1 mg/ml środowiska. Merkaptan dodaje się w ilości dostarczającej do około 5 grup -SH na grupę -SSO₃⁻. Otrzymaną mieszaninę, którą utrzymuje się zasadniczo bez dostępu powietrza lub innego środka utleniającego oziębia się do temperatury około 4–6°C, i utrzymuje w tej temperaturze do zakończenia reakcji. Czas reakcji wynosi na ogół około 5–72 godziny, częściej około 15–24, zwykle około 18–20 godzin.

Po zakończeniu reakcji produkt, który jest prekursorem insuliny, można wyodrębnić stosując jakikolwiek z różnorodnych sposobów uznawanych w dziedzinie oczyszczania insuliny. Najczęściej stosuje się techniki chromatograficzne, do których należy np. chromatografia żelowa lub chromatografia jonowymienna.

Otrzymany prekursor insuliny można przeprowadzić w insulinę drogą enzymatyczną lub chemiczną stosując znane sposoby. Do sposobów tych należy np. odszczepianie z zastosowaniem trypsyny i karboksypeptydazy B (Kemmler i inni, J. Biol. Chem. 246, 6786–6791 (1971)).

Produkt insuliny można ocenić pod względem czystości i czynności względnej stosując znane sposoby, takie jak elektroforeza w żelu poliakrylamidowym, analiza aminokwasów, próba radioreceptorowa, próba radioimmunologiczna, ciśnieniowa

chromatografia cieczowa (HPLC), widmo w nadfiolecie, dansylacja, próba glikozowa krwi króliczej itp.

S-sulfonian prekursora insuliny o liniowym łańcuchu będące substancjami wyjściowymi można wytworzyć stosując sposoby polegające na rekombinacji DNA. Można je również wytworzyć z naturalnych insulin i proinsulin, a także stosując klasyczne sposoby syntezy białek, do których należą techniki reakcji w roztworze lub w fazie stałej.

S-sulfonian prekursora insuliny o liniowym łańcuchu można wytworzyć z proinsuliny w następujący sposób. Do 100 ml dejonizowanego 7m mocznika, który umieszcza się w chłodnym pomieszczeniu, dodaje się 786 mg siarczynu sodowego. Roztwór miesza się dokładnie. Następnie dodaje się 594 czterotioianu sodowego. Po rozmieszaniu duża część czterotioianu rozpuszcza się, jednak roztwór pozostaje mętny. Odczyn roztworu doprowadza się do wartości pH, 7,7 używając lodowatego kwasu octowego. Następnie dodaje się podczas mieszania 503 mg oczyszczonej za pomocą HPLC proinsuliny wołowej. Odczyn roztworu ponownie doprowadza się do wartości pH 7,6 używając 2n wodorotlenku sodowego. Otrzymany lekko mętny roztwór miesza się w temperaturze 6°C w ciągu 18 godzin.

Odczyn około połowy mieszaniny reakcyjnej doprowadza się do wartości pH 9,1 używając 2n wodorotlenku sodowego i wprowadza się do kolumny Sephadex G-25 Coarse. Stosuje się następujące warunki chromatografowania: rozpuszczalnik 0,05m wodorowęglan amonowy, pH 9,0, rozmiary kolumny 2×90 cm, temperatura 21°C, szybkość przepływu 18,5 ml/minutę. Początkowe 120 ml eluantu usuwa się, a następnie 75 ml zbiera się i zachowuje. Następnie kolumnę przemywa się kolejną ilością 400 ml 0,05 m wodorowęglanu sodowego o pH 9,0. Ten tok postępowania powtarza się dla drugiej połowy mieszaniny reakcyjnej. Wydajność wyodrębnionych dwóch porcji określona za pomocą spektroskopii UV wynosi 401 mg. Porcje te łączy się i liofilizuje do sucha. Zbiera się 445,7 mg suchego odsolonego produktu. Budowę produktu, S-sulfonianu proinsuliny wołowej o liniowym łańcuchu oraz brak substancji wyjściowej potwierdza elektroforeza w ocenie celulozy i elektroforeza dyskowa na żelu poliakrylamidowym.

S-sulfonian proinsuliny bydlęcej o liniowym łańcuchu oczyszcza się za pomocą chromatografii DEAE celulozowej, 443 mg surowej próbki rozpuszcza się w 10 ml roztworu zawierającego 7,5m mocznik, 0,01m trójhidroksymetyloaminometan i 0,001m kwas etylenodwuaminoczwerooctowy o pH 8,5 i wprowadza na kolumnę DEAE celulozową. Stosuje się następujące warunki chromatografowania: jako rozpuszczalnik roztwór o składzie 7,5m mocznik, 0,01 trójhidroksymetyloaminometan i 0,001m kwas etylenodwuaminoczwerooctowy przy wzrastającym stężeniu 0–0,35m chlorku sodowego, wymiary kolumny 2,5×90 cm, temperatura 4°C, szybkość przepływu około 0,9 ml/minutę, objętość frakcji 5,3 ml.

Zależność absorbancji każdej frakcji przy 276 nm od numeru frakcji wykazuje duży pik obniżający się łagodnie. Na podstawie analizy widna UV

stwierdzono, że pik ten odpowiada produktowi. Łączy się frakcje 199–240 o objętości eluatu 1069–1291 ml. Wydajność produktu w tej próbie określona na podstawie spektroskopii UV wynosi 355 mg.

Porcję produktu odsala się na kolumnie Sephadex G-25 Coarse. Stosuje się następujące warunki chromatografowania: jako rozpuszczalnik 0–0,5M wodorowęglan sodowy, pH 8,0, rozmiary kolumny $2,7 \times 105$ cm, temperatura 4°C, szybkość przepływu 16,0 ml/minutę. Początkowe 395 ml eluatu usuwa się a następne 250 ml zbiera się i zachowuje. Następnie kolumnę przemywa się dodatkowymi 2000 ml, 0,05M wodorowęglanu amonowego o pH 8,0. Wydajność produktu w tej próbie określona na podstawie spektroskopii UV wynosi 321 mg. Próbkę liofilizuje się do sucha. Zbiera się 373 mg suchej substancji. Produkt identyfikuje się za pomocą elektrofozy dyskowej w żelu poliakrylamidowym oraz ciśnieniowej chromatografii cieczowej o wysokiej rozdzielczości na podstawie punktu elucji.

Przykład I. Zastosowanie stężenia 0,1 mg/ml. Przygotowuje się roztwór 1,61 mg S-sulfonianu proinsuliny bydlęcej o liniowym łańcuchu, którą rozpuszcza się w 16,1 ml odgazowanej 0,5M glicyny o odczynie pH 0,5. Do tego roztworu dodaje się 0,158 ml podstawowego roztworu wodnego 2-merkaptotetanolu o stężeniu merkaptanu 2,11 mg/ml jak wykazuje miareczkowanie odczynnikiem Ellmana. Odpowiada to 4 równoważników 2-merkaptotetanolu na jeden $-SSO_3^-$ w S-sulfonowanie proinsuliny bydlęcej o liniowym łańcuchu. Końcowy odczyn pH wynosi 9,46. Roztwór przygotowany w temperaturze pokojowej zamyka się parafilmem, po czym miesza się odciążając w temperaturze 6°C w ciągu 19 godzin.

Następnie mieszaninę reakcyjną zakwasza się do wartości pH $4,0 \pm 0,1$ (w ustalonej temperaturze) używając stężonego kwasu solnego i 0,5M wodorotlenku sodowego. Produkt wyodrębnia się i sprawdza za pomocą ciśnieniowej chromatografii cieczowej o wysokiej rozdzielczości HPLPLC. Stosuje się następujące warunki HPLPLC: kolumna szklana o wymiarach $1,1 \times 54$ cm wypełniona wypełniaczem LP-1/C₁₈ 16,0% C, rozpuszczalnik-roztwór 30% acetonitrylu i 70% 0,1M mrówczanu amonowego o pH 4,25, temperatura 21°C, ciśnienie 805 kPa i szybkość przepływu 2,40 ml/minutę. Próbki wprowadza się do kolumny za pomocą wtryskiwacza pętlowego o pojemności 5 ml i wykrywa przy długości fali 280 nm.

Jako pierwszą próbkę wprowadza się 5 ml roztworu podstawowego proinsuliny bydlęcej o nominalnym stężeniu białka 0,1 mg/ml. Jako drugą próbkę wprowadza się 5 ml zakwaszonej mieszaniny reakcyjnej. Obecność monomerycznej proinsuliny bydlęcej w mieszaninie reakcyjnej stwierdza się na podstawie punktu elucji. Wydajność proinsuliny bydlęcej w mieszaninie reakcyjnej obliczona na podstawie powierzchni pików, dwóch przebiegów HPLPLC wynosi 82,6% wydajności teoretycznej.

Przykład II. Zastosowanie stężenia 0,5 mg/ml.

Przygotowuje się roztwór 25,07 mg S-sulfonianu proinsuliny bydlęcej o liniowym łańcuchu, rozpuszczonego w 50,14 ml odgazowanej 0,05M glicyny o odczynie pH 10,51. Do roztworu dodaje się 1,302 ml

wodnego roztworu podstawowego 2-merkaptotetanolu o stężeniu 2,10 mg/ml jak wykazuje miareczkowanie odczynnikiem Ellmana. Odpowiada to 2,1 równoważników 2-merkaptotetanolu na jeden $-SSO_3^-$ w S-sulfonowanie proinsuliny bydlęcej o liniowym łańcuchu. Końcowy odczyn pH wynosi 10,47. Przygotowany w temperaturze pokojowej roztwór zamyka się parafilmem, po czym miesza się odciążając w temperaturze 6°C w ciągu 18 godzin.

Następnie mieszaninę reakcyjną zakwasza się do wartości pH $4,0 \pm 0,1$ (w ustalonej temperaturze) używając stężonego kwasu solnego i 0,1M kwasu solnego. Wydajność proinsuliny bydlęcej w mieszaninie reakcyjnej określona na podstawie HPLPLC wynosi 88% wydajności teoretycznej. Produkt po odciążeniu wyodrębnia się stosując chromatografię żelową. Odczyn mieszaniny reakcyjnej doprowadza się do wartości pH 9,0 używając stężonego wodorotlenku amonowego, po czym mieszaninę wprowadza się do kolumny Sephadex G-25 Coarse. Stosuje się następujące warunki odsalania chromatograficznego: rozpuszczalnik 0,05M wodorowęglan amonowy, pH 9,0, rozmiary kolumny 2×100 cm, temperatura 21°C, szybkość przepływu 18,5 ml/minutę. Początkowe 120 ml eluatu usuwa się, a następnie 75 ml zbiera się i zachowuje (partia biała). Następnie kolumnę przemywa się dodatkowymi 400 ml 0,01M wodorotlenku amonowego o pH 9,0. Białko odzyskuje się z wydajnością 21,6 mg określoną na podstawie spektroskopii UV partii białka. Partię tę liofilizuje się do sucha. Zbiera się 22,21 mg suchego, odsolonego białka.

Porcję tej substancji w ilości 14,84 mg rozpuszcza się w 5,5 ml 1,0M kwasu octowego. Spektroskopia UV czystego roztworu wskazuje na stężenie białka 2,56 mg/ml. 5 ml powyższego roztworu (12,8 mg na podstawie UV) wprowadza się do kolumny Sephadex G-50 Superfine. Stosuje się następujące warunki chromatografowania: rozpuszczalnik 1M kwas solny, rozmiary kolumny $1,5 \times 100$ cm, temperatura 21°C, szybkość przepływu 0,19 ml/minutę, objętość frakcji około 1,9 ml.

Po przemywaniu kolumny 1M kwasem octowym w ciągu nocy sprawdza się absorbcję przy 280 nm. Na wykresie otrzymuje się dwa piki. Pierwszy mniejszy odpowiada zagregowanym postaciom proinsuliny wołowej. Drugi pik odpowiada monomerycznej proinsulinie wołowej. Partie frakcji odpowiadające dwóm pikom zbiera się i łączy poszczególne frakcje. Otrzymuje się następujące objętości eluatu:

Partia I: Frakcja 30–46 (55,0–84,0 ml; pik 76,4 ml)
Partia II: Frakcje 47–62 (84,0–112,0 ml; pik 90,2 ml)

Spektroskopia UV wskazuje na obecność 1,94 mg proinsuliny wołowej w partii I i 10,11 mg w partii II. Daje to ilość całkowitą 12,05 mg i odpowiada 94,1% ilości wprowadzonej do kolumny. Z tej ilości 83,9% odpowiada monomerycznej proinsulinie wołowej.

Obie partie liofilizuje się do sucha. Produkt w partii II uznaje się za proinsulinę wołową na podstawie punktu elucji podczas przebiegu HPLPLC. Produkt sprawdza się również działając na mięso trypsyną i karboksypeptydazą. B. zgodnie z literaturowym tokiem postępowania wytwarzania insuliny wołowej.

Przykład III. Wpływ temperatury.

Tok postępowania z przykładu I stosuje się do określenia wpływu temperatur na wydajność proinsuliny bydlęcej otrzymanej z S-sulfonianu proinsuliny bydlęcej o liniowym łańcuchu. Reakcję prowadzi się przy stężeniu białka 0,1 mg/ml w 0,05m glicynowym roztworze buforowym przy pH 9,5 stosując jako merkaptan 2-merkaptetoetanol w ilości dostarczającej 4 równoważniki -SH na jeden -SSO₃⁻ w ciągu 18 godzin.

Przy prowadzeniu reakcji w temperaturze 21°C wydajność proinsuliny bydlęcej określona za pomocą HPLPLC wynosi 47% wydajności teoretycznej. Jeżeli natomiast reagenty zmiesza się w temperaturze 21°C, a następnie obniży się temperaturę mieszaniny do temperatury 6°C wydajność wynosi 77% wydajności teoretycznej.

Przykład IV. Wpływ pH.

Tok postępowania z przykładu I stosuje się do określenia wpływu pH na wydajność proinsuliny bydlęcej otrzymanej z S-sulfonianu proinsuliny bydlęcej o liniowym łańcuchu w serii reakcji, które prowadzi się równocześnie. Reakcję prowadzi się przy stężeniu białka 0,5 mg/ml w 0,05m glicynowym roztworze buforowym stosując jako merkaptan 2-merkaptetoetanol w ilości dostarczającej 2 równoważniki -SH na jeden -SSO₃⁻ w ciągu 18 godzin w temperaturze 6°C.

Wydajności proinsuliny określone za pomocą HPLPLC są następujące:

pH	Wydajność, %
9,0	43,1
9,5	44,3
10,0	66,7
10,5	76,0
11,0	61,0

Przykład V. Wpływ stężenia białka

Tok postępowania z przykładu I stosuje się do określenia wpływu stężenia białka na wydajność proinsuliny bydlęcej otrzymanej z S-sulfonianu proinsuliny bydlęcej o liniowym łańcuchu w serii reakcji, które prowadzi się równocześnie. Reakcję prowadzi się w 0,05m glicynowym roztworze buforowym przy pH 9,5 stosując jako merkaptan 2-merkaptetoetanol w ilości dostarczającej 4 równoważniki -SH na jeden -SSO₃⁻ w ciągu 18 godzin w temperaturze 6°C.

Wydajności proinsuliny określone za pomocą HPLPLC są następujące:

Stężenie białka, mg/ml	Wydajność, %
0,1	78
0,2	63
0,3	46
0,4	37,6
0,5	25,4
1,0	12

Prowadząc drugą serię reakcji dla 2 równoważników -SH na jeden -SSO₃⁻ i pH 10,5 otrzymuje się następujące wyniki:

Stężenie białka, mg/ml	Wydajność, %
1	?
0,5	77,2

c. d. tabeli

1	2
0,96	58,3
1,83	19,5
4,2*	20,1
7,4*	19,6

* stosunek równoważnikowy -SH do -SSO₃⁻ = 1,2

Przykład VI. Wpływ stosunku równoważnikowego -SH do SSO₃⁻.

Tok postępowania z przykładu I stosuje się do określenia wpływu stosunku równoważnikowego -SH do -SSO₃⁻ na wydajność proinsuliny bydlęcej otrzymanej z S-sulfonianu proinsuliny bydlęcej o liniowym łańcuchu w serii reakcji, które prowadzi się równocześnie. Reakcję prowadzi się przy stężeniu białka 0,5 mg/ml stosując 0,05m glicynowy roztwór buforowy przy pH 9,5 w ciągu 18 godzin w temperaturze 6°C.

Wydajności otrzymanej insuliny określone za pomocą HPLPLC są następujące:

Stosunek równoważnikowy -SH do -SSO ₃ ⁻	Wydajność, %
4,0	30,8
2,0	44,7
1,0	37,0
0,5	4,5

Przykład VII. Wpływ rodzaju merkaptanu. Tok postępowania z przykładu I stosuje się do określenia wpływu budowy merkaptanu na wydajność proinsuliny bydlęcej otrzymanej z S-sulfonianu proinsuliny bydlęcej o liniowym łańcuchu w serii reakcji, które prowadzi się równocześnie. Reakcję prowadzi się przy stężeniu białka 0,1 mg/ml w glicynowym roztworze buforowym przy pH 9,5 stosując merkaptan w ilości 4 równoważników -SH na jeden -SSO₃⁻ w ciągu 18 godzin w temperaturze 6°C.

Wydajności proinsuliny określone za pomocą HPLPLC są następujące:

Merkaptan	Wydajność, %
Dwutiotreitol	39,3
Dwutioerytryt	34,9
Tioglikolan metylu	56,1
3-merkaptto-1,2-propanodiol	65,5
kwas 3-merkaptopropionowy	65,3
2-merkaptetoetanol	64,1

Przykład VIII. Wpływ rodzaju białka.

Tok postępowania z przykładu I stosuje się do określenia wpływu rodzaju białka na wydajność proinsuliny otrzymanej z S-sulfonianu proinsuliny o liniowym łańcuchu w serii reakcji, które prowadzi się równocześnie. Reakcję prowadzi się przy stężeniu białka 0,1 mg/ml w 0,05m glicynowym roztworze buforowym przy pH 9,5 stosując jako merkaptan 2-merkaptetoetanol w ilości dostarczającej 4 równoważniki -SH na jeden -SSO₃⁻ w ciągu 18 godzin w temperaturze 6°C.

Wydajności proinsuliny określone za pomocą HPLPLC są następujące:

S-sulfonian proinsuliny o liniowym łańcuchu	Wydajność, %
bydłęcy	60,6
wieprzowy	65,8

Przykład IX Wytwarzanie insuliny ludzkiej.

Przygotowuje się roztwór 169,3 mg wytworzonego biosyntetycznie S-sulfonianu proinsuliny ludzkiej o liniowym łańcuchu, który rozpuszcza się w 338,6 ml odgazowanej glicyny o pH 10,54. Do otrzymanego roztworu dodaje się 7,71 ml wodnego roztworu podstawowego 2-merkaptioetanolu o stężeniu merkaptanu 2,08 mg/ml jak to wskazuje miareczkowanie odczynnikami Ellmana. Odpowiada to 2 równoważnikom -SH na jeden -SSO₃⁻ w S-sulfonanie proinsuliny ludzkiej o liniowym łańcuchu. Odczynnik końcowy roztworu doprowadza się do wartości pH 10,52 dodając niewielką ilość 5n wodorotlenku sodowego. Roztwór zamyka się parafilmem i miesza w temperaturze 6°C w ciągu 18 godzin.

Następnie mieszaninę reakcyjną zakwasza się do wartości pH 2,9 ± 0,1 (w ustalonej temperaturze) używając stężonego kwasu solnego. Otrzymany klarowny roztwór wprowadza się do kolumny odsalającej Sephadex G-25 Coarse. Stosuje się następujące warunki chromatografowania: rozpuszczalnik 2% kwas octowy (objętościowo), rozmiary kolumny 5 × 100 cm, temperatura 25°C, szybkość przepływu 28,8 ml/minutę, objętość frakcji 20,2 ml.

Początkowe 779 ml eluatu usuwa się, a następnie 464 ml zbiera się i zachowuje. Na podstawie absorpcji przy 280 nm stwierdza się, że otrzymaną frakcję zawiera białko. Kolumnę przemywa się dodatkowymi 2500 ml 2% kwasu octowego. Obliczenia dokonane na podstawie widma UV partii zawierającej białko wykazują, że odzyskuje się 164 mg białka co odpowiada 101,9% ilości wprowadzonej do kolumny (wydajność teoretyczna reakcji przekształcenia). Partię zamraża się i liofilizuje do sucha.

Wymagany produkt wyodrębnia się za pomocą chromatografii żelowej. Suchą substancję (nie zważoną) rozpuszcza się w 20 ml 1M kwasu octowego. Otrzymany klarowny roztwór wprowadza się do kolumny Sephadex G-50 Superfine. Stosuje się następujące warunki chromatografowania: rozpuszczalnik 1M kwas octowy, rozmiary kolumny 2,5 × 125 cm, temperaturę 25°C, szybkość przepływu około 0,82 ml/minutę, objętość frakcji około 4,92 ml.

Po przemywaniu kolumny 1M kwasem octowym w ciągu nocy sprawdza się absorpcję przy 280 nm. Na wykresie absorpcji przy 280 nm otrzymuje się dwa główne piki. Pierwszy mniejszy pik odpowiada zagregowanym postaciom proinsuliny ludzkiej. Drugi pik odpowiada monomerycznej proinsulinie ludzkiej. Pik ten posiada garb na przednim ramieniu. Zebrane frakcje łączy się w trzy partie otrzymując następujące objętości eluatu:

Partia I: frakcje 46—67 (218—325,5 ml),
Partia II: frakcje 68—81 (325,5—395,5 ml),
Partia III: frakcje 82—100 (395,5—490,3 ml).

Na podstawie widma UV oblicza się, że partie zawierają następujące ilości białka:

Partia I: 22,1 mg

Partia II: 28,3 mg

Partia III: 103,6 mg.

Daje to całkowitą ilość 154 mg co odpowiada odzyskaniu 94% ilości wprowadzonej do kolumny. Z tej ilości 67,3% odpowiada monomerycznej proinsulinie ludzkiej. Wszystkie trzy partie zamraża się i liofilizuje do sucha.

Z partii III zbiera się całkowitą ilość 106,55 mg suchej substancji. Uznaje się ją za proinsulinę ludzką na podstawie analizy aminokwasów i elektroforezy dyskowej w żelu polikryloamidowym. Stosując HPLC wymywa się ją w punkcie, w którym oczekuje się elucji proinsuliny ludzkiej określonym w stosunku do proinsuliny wołowej. Ponadto otrzymaną proinsulinę sprawdza się poddając ją działaniu trypsyny i karboksypeptydazy B w wyniku czego otrzymuje się insulinę ludzką.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania prekursora insuliny o wzorze 1, w którym R oznacza atom wodoru, Y oznacza grupę o wzorze 2, w którym Z oznacza Ala, ugrupowania od A-1 do A-21 są insulinowym łańcuchem A insuliny bydłowej lub świńskiej, ugrupowania od B-1 do B-30 są insulinowym łańcuchem B insuliny bydłowej lub świńskiej, a X oznacza ugrupowanie, które łączy się z łańcuchem A insuliny przy aminowej grupie A-1, a z łańcuchem B insuliny przy ε-aminowej grupie B-29 lub karboksylowej grupie B-30, przy czym ugrupowanie to można chemicznie lub enzymatycznie odszczepić od obu łańcuchów A i B bez ich rozerwania, polegający na tym, że S-sulfonian o wzorze 3, w którym R, X i Y mają wyżej podane znaczenie poddaje się reakcji z merkaptanem, **znamienny tym**, że merkaptan stosuje się w ilości dostarczającej około 1—5 grup -SH na każdą grupę -SSO₃⁻, w roztworze wodnym o pH około 7—11,5, przy stężeniu S-sulfonianu do około 10 mg/ml środowiska wodnego, w temperaturze około 0—37°C, przy czym sposób realizuje się jednoetapowo, w środowisku zasadniczo wolnym od środków utleniającego.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się związek o wzorze 3, w którym X oznacza ugrupowanie peptydowe pochodzące z łańcucha C proinsuliny świńskiej.

3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że stosuje się związek o wzorze 3, w którym X oznacza ugrupowanie peptydowe pochodzące z łańcucha C proinsuliny bydłowej.

4. Sposób według zastrz. 1 lub 2, **znamienny tym**, że reakcję korzystnie prowadzi się przy pH około 9,5—10,5.

5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że korzystnie stosuje się merkaptan w ilości dostarczającej 2—4 grup -SH na 1 grupę -SSO₃⁻.

6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że korzystnie stosuje się stężenie S-sulfonianu około 0,05—2 mg/ml środowiska wodnego.

7. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako merkaptan stosuje się 2-merkaptioetanol

8. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że reakcję korzystnie prowadzi się w temperaturze około 2—8°C.

9. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że mieszaninę reakcyjną przygotowuje się w temperaturze zbliżonej do pokojowej, a reakcję prowadzi się oziębiając mieszaninę reakcyjną do temperatury 2—8°C.

10. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że utrzymuje się pH mieszaniny reakcyjnej dodając środka buforującego w stężeniu około 0,005—0,5n.

11. Sposób według zastrz. 10, **znamienny tym**, że jako środek buforujący stosuje się glicynę.

12. Sposób wytwarzania prekursora insuliny o wzorze 1, w którym R oznacza atom wodoru, Y oznacza grupę o wzorze 2, w którym Z oznacza Thr, ugrupowania od A-1 do A-21 są insulinowym łańcuchem A insuliny ludzkiej, ugrupowania od B-1 do B-30 są insulinowym łańcuchem B insuliny ludzkiej, a X oznacza ugrupowanie, które łączy się z łańcuchem A insuliny przy aminowej grupie A-1, a z łańcuchem B insuliny przy ε-aminowej grupie B-29 lub karboksylowej grupie B-30, przy czym ugrupowanie to można chemicznie lub enzymatycznie odszczepić od obu łańcuchów A i B bez ich rozerwania, polegający na tym, że S-sulfonian o wzorze 3, w którym R, X i Y mają wyżej podane znaczenie poddaje się reakcji z merkaptanem, **znamienny tym**, że merkaptan stosuje się w ilości dostarczającej około 1—5 grup -SH na każdą grupę -SSO₃⁻, w roztworze wodnym o pH około 7—11,5, przy stężeniu S-sulfonianu do około 10 mg/ml środowiska wodnego, w temperaturze około 0—37°C, przy czym sposób realizuje się jednoetapowo w środowisku zasadniczo wolnym od środka utleniającego.

13. Sposób według zastrz. 12, **znamienny tym**, że stosuje się związek o wzorze 3, w którym X oznacza ugrupowanie peptydowe łańcucha C proinsuliny ludzkiej.

14. Sposób według zastrz. 12, **znamienny tym**, że stosuje się związek o wzorze 3, w którym X oznacza ugrupowanie peptydowe łańcucha C proinsuliny świńskiej.

15. Sposób według zastrz. 12, **znamienny tym**, że stosuje się związek o wzorze 3, w którym X oznacza ugrupowanie peptydowe łańcucha C proinsuliny bydłowej.

16. Sposób według zastrz. 12, **znamienny tym**, że reakcję korzystnie prowadzi się przy pH około 9,5—10,5.

17. Sposób według zastrz. 12, **znamienny tym**, że korzystnie stosuje się merkaptan w ilości dostarczającej 2—4 grup -SH na 1 grupę -SSO₃⁻.

18. Sposób według zastrz. 12, **znamienny tym**, że korzystnie stosuje się stężenie S-sulfonianu około 0,05—2 mg/ml środowiska wodnego.

19. Sposób według zastrz. 12, **znamienny tym**, że jako merkaptan stosuje się 2-merkaptoetanol.

20. Sposób według zastrz. 12, **znamienny tym**, że reakcję korzystnie prowadzi się w temperaturze około 2—8°C.

21. Sposób według zastrz. 12, **znamienny tym**, że mieszaninę reakcyjną przygotowuje się w temperaturze pokojowej a reakcję prowadzi się oziębiając mieszaninę reakcyjną do temperatury 2—8°C.

22. Sposób według zastrz. 12, **znamienny tym**, że utrzymuje się pH mieszaniny reakcyjnej dodając środka buforującego w stężeniu około 0,005—0,5n.

23. Sposób według zastrz. 22, **znamienny tym**, że jako środek buforujący stosuje się glicynę.

