

(19)



(10) **LT 3329 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patento numeris: **3329**

(51) Int.Cl.⁵: **C07K 3/20**

(21) Paraiškos numeris: **IP713**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 06 25**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 01 31**

(45) Patento paskelbimo data: **1995 07 25**

(60) SU duomenys: **SU 5001389, 1991 09 03**

(31,32,33) Prioritetas: **40 28 120.5, 1990 09 05, DE**

(72) Išradėjas:

Rainer Dickhardt, DE

Bernhard Unger, DE

Leonard Haefner, DE

(73) Patento savininkas:

HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, D-65926 Frankfurt am Main, DE

(74) Patentinis patikėtinis:

Reda Žabotienė, 7, UAB "Metida", Pilies g. 3/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Insulino gryninimo metodas

(57) Referatas:

Aprašytas insulinių ir jų darinių chromatografinio gryninimo ant lipofiliškai modifikuoto silikagelio metodas, panaudojant vandeninius buferinius tirpalus, į kurių sudėtį įeina su vandeniu besimaišantys organiniai tirpikliai, be to, vandeninių buferinių tirpalų sudėtyje yra amfoteriniai jonai arba tirpiklių mišinio pH reikšmė yra artima gryninamo insulino arba jo darinių izoelektriniam taškui ir dalyvauja amfoteriniai jonai.

- Išradimas skirtas insulino ir/arba jo darinių chromatografijai gryninimo ant lipofiliškai modifikuoto silikagelio metodui, panaudojant vandeninius, buferinius tirpalus, į kurių sudėtį įeina besimaišantys su vandeniu organiniai tirpikliai, be to, vandeniniame buferiniame tirpale ištirpinti jonai ir/arba tirpalo pH reikšmė yra artima gryninamo insulino arba jo darinio izoelektriniam taškui.
- 10 Iš analitinių išskyrimo metodų yra žinomas insulino arba jų darinių gryninimas ant lipofiliškai modifikuotų silikagelių (grižtamoji fazė), kuri daugelį metų sėkmingai naudojama AESCh (aukšto efektyvumo skysčių chromatografija) (WS Welinder ir kt., J. Chrom. 361, 15 1986, 357-367). Dirbant analitiniais kiekiais, baltymas (μm) įleidžiamas į stiklo arba plastmasės kolonėlę ir po to plaunamas pratekančiu skysčių mišinio eluentu (daugiausia rūgštūs, vandeniniai, buferiniai tirpalai su pastovia arba besikeičiančia organinio tirpiklio koncentracija). Šiuo atveju baltymo pilama mažiau kaip 20 $30 \mu\text{m}/\text{ml}$ kolonėlės tūrio.
- Iki šiol gryninimo metoduose dažnai naudojami palyginti toksiški, laboratorijoje naudojami tirpikliai (acetonitrilas) bei koroziją sukeliantys brangūs buferiniai komponentai, pavyzdžiui, tetraalkilamonio druskos, alkilsulfonatai, heksafluoracetonas, trifluoracetatas (E.P. Kroeff ir kt., J. Chrom., 461, 1989, 45-61. Mišinių, stipriai užterštų panašiomis į insuliną medžiagomis, atveju patenkinamas preparatyvinis atskyrimas, naudojant šiuos tirpiklius, yra nepasiekiamas, turint omenyje, šiuo atveju, kokybę, pagrindinių komponentų išėigą ir jų bendrą kiekį (J. Rivier, R. McClintock, J. Chrom., 268, 1983, 112-119; Peter ir 30 kt., J. Chrom., 408, 1987, 43-52).
- 35

Insulinai, gauti prieš tai įvykdytų cheminių reakcijų metu, pavyzdžiui, stipriai rūgštinio eterinio skaidymo arba fermentinių (trans-)peptidinių procesų, kristalizacinio gryninimo procesų metu dažniausiai turi

5 panašiomis savybėmis pasižyminčių priemaišų. Juos galima išgryninti, parinkus atitinkamą pH reikšmę, jonų mainų chromatografijos metodu, jei tik yra pakankamas potencialų skirtumas (US Nr. 4129560). Šio metodo trūkumas - praskiedimo efektas, kadangi jo metu,

10 perdirbant nuosėdas, prarandamos vertingos medžiagos, be to, palyginti ilgas ciklas bei nedidelis galutinio produkto kiekis ir išeiga.

Preparatyvinis išskyrimas iš principo yra galimas,

15 didinant kolonėlės tūrį, užpildymo laipsnį ir eliuento sunaudojimą. Būtinai organinių tirpiklių kiekiai yra m^3 eilės, pavyzdžiui, kolonėlės, kurios diametras daugiau kaip 20 cm, atveju. Analitinėje AESCh naudojami tirpikliai (pavyzdžiui, acetonitrilas, DMFA, metanolis,

20 dioksanas ir kt.) yra toksiški, todėl šių metodų panaudojimas preparatyvinėje gamyboje reikalauja išlaidų apsaugos priemonėms. Šio išradimo tikslas yra insulinų ir jų darinių chromatografinio gryninimo metodo sukūrimas, kurio metu išlieka insulinų

25 biologinis aktyvumas. Chromatografiniu metodu pasiekiamas aukštas švarumo laipsnis, sutrumpėja ciklo trukmė, kolonėlės eksploatacijos trukmė siekia daugiau kaip 50 chromatografinių ciklų, silikagelio stacionarinė fazė regeneruojama be ilgo sutankinimo proceso,

30 panaudojami netoksiški tirpikliai, visa tai palengvina preparatyvinio išskyrimo panaudojimą gamybiniu mastu.

Sukurtas metodas, kuriuo remiantis galima išgryninti insuliną ir jo darinius chromatografiniu būdu vandeni-

35 niuose, buferiniuose tirpikliuose, kurių sudėtyje yra su vandeniu besimaišantys tirpikliai, ant lipofiliškai modifikuoto silikagelio, besiskiriantis tuo, kad

buferiniuose tirpikliuose ištirpinti amfoteriniai jonai arba tirpiklio pH reikšmė yra artima gryninamo insulino arba jo darinio izoelektriniam taškui ir dalyvauja amfoteriniai jonai.

5

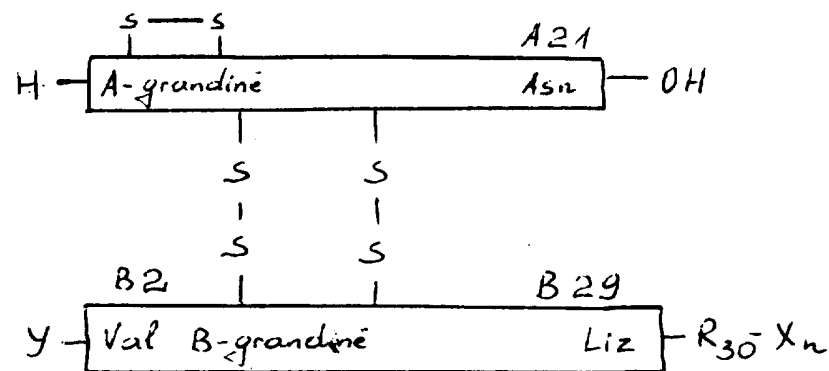
Amfoterinių jonų dalyvavimas arba chromatografija, kai tirpiklio pH reikšmė yra artima gryninamo insulino izoelektriniam taškui ir amfoterinių jonų dalyvavimas palengvina ne tik vertingo produkto gerą atskyrimą nuo priemaišų, bet ir gerą baltymų atskyrimą nuo stacionarinės fazės (lipofiliškai modifikuotas silikagelis). Pasiekiamas toks atskyrimas, kad galima išgryninti netgi insulino tirpalus, užterštus į insuliną panašiais komponentais, pavyzdžiui, A21-dezamidoinsulinas atskiriamas nuo insulino ir jo darinių. Be to, sėkmingai atskyrus baltymus nuo kietos fazės, pailgėja kolonėlės eksploatacijos trukmė ir galima padidinti insulino išeigą.

20 Taigi, išradimas skirtas insulino ir/arba jo darinių chromatografiniam gryninimo metodui vandeniniuose, buferiniuose tirpikliuose, į kurių sudėtį įeina su vandeniu besimaišantys organiniai tirpikliai, ant lipofiliškai modifikuoto silikagelio, besiskiriančiam tuo, kad buferiniuose tirpikliuose ištirpinti amfoteriniai jonai arba tirpiklių mišinio pH reikšmė yra artima gryninamo insulino ar jo darinių izoelektriniam taškui ir dalyvauja amfoteriniai jonai.

30 Remiantis šiuo išradimo metodu, gali būti panaudoti visi insulintai, pavyzdžiui, visų rūšių žmogaus arba gyvulinės kilmės insulintai, insulino pirmtakai, tokie kaip, pavyzdžiui, proinsulinas arba pre-proinsulinas, rekombinuoti insulintai arba jų dariniai, išskirti iš genetiškai modifikuotų mikroorganizmų. Taip pat galima įvesti insulino darinius, gautus cheminių arba fermentinių reakcijų metu, pavyzdžiui, dez-Fen-BI-

insulinas, insulin- β -keten-sulfonatas, diarginininsulinas (B31, B32), monoarginininsulinas arba difenilalanininsulinas (B31, B32) (US Nr. 4601852).

5 Dažniausiai įveda insulino darinius, kurių formulė (1),



kur

R_{30} - genetiškai koduotos L-aminorūgšties liekana,

10 X - hidroksigrupė; fiziologiškai inertinė bazinio tipo organinė grupė, C_1 - C_{50} ; genetiškai koduota L-aminorūgštis, gale turinti laisvą karboksilo funkcinę grupę, tokią kaip, pavyzdžiui, esterinę, amidinę, laktono grupę arba redukuotą iki CH_2OH grupę,

n - sveikas skaičius nuo 0 iki 10,

Y - vandenilis arba L-fenilalaninas,

20 A - ir B-grandinės - žmogaus arba gyvulinės kilmės insulino grandinės. Pirmenybė ypač teikiama formulės (1) insulino dariniams, kur R_{30} - L-alaninas arba L-treoninas ir

25

X - viena arba kelios L-aminorūgštys, priklausančios L-arginino, L-lizino arba L-fenilalanino grupei.

Insulinai ir jų dariniai gali būti įvedami tiek santykinai nevalytoje formoje, tiek ir preliminariai išvalytoje formoje (pavyzdžiui, chromatografiškai). Po daugkartinės kristalizacijos, o taip pat ir po gel-chromatografijos insulinas dar yra užterštas panašiomis į insuliną, artimų molekulinų masių lydinčiomis priemaišomis, kurios, esant tam tikrai parinktai pH reikšmei, įtemptame būvyje skiriasi viena nuo kitos ir nuo insulino, bet su insulinu sudaro kompleksus (US Nr. 4129560). Tokių medžiagų pavyzdžiu gali būti insulin-etilo esteris ir kt. Lipofiliškai modifikuotas silikagelis yra toks silikagelis, kuris padengtas hidrofobine matrica. Pavyzdžiui, hidrofobine matrica galima naudoti alkanus su ilga grandine (nuo C_3 iki C_{20}). Ypač geri yra šie lipofiliškai modifikuoti silikageliai:

20

- (R) NUKLEOSIL, firma MACHEREY + NAGEL

sferinės ir nesferinės medžiagos su skirtingu grūdelių dydžiu (iki $45\ \mu\text{m}$), porų dydis iki $100\text{\AA}$, modifikuoti C_8 arba C_{18} ;

25

- (R) LICHREPREP, firma MERCK

nesferinės arba sferinės medžiagos su skirtingu grūdelių dydžiu (iki $40\ \mu\text{m}$), porų dydis $60\text{--}250\text{\AA}$, modifikuoti $C_8\text{--}C_{18}$;

30

- (R) LICHREPREP SELECT, firma MERCK

sferinės medžiagos, kurių grūdelių dydis iki $25\ \mu\text{m}$, modifikuotas C_8 ;

35

- (R) WATERS PREP

modifikuotas C_{18} , nesferiniai grūdeliai 50-105 μm dydžio, porų dydis 100Å;

5

- (R) ZORBAX PRO 10, firma DU PONT

modifikuotas C_8 , 10 μm , sferiniai grūdeliai, porų dydis 100Å;

10

- (R) KROMASIL, firma EKA NEHEL

modifikuotas C_4 -, C_8 - C_{18} , iki 16 μm , sferiniai grūdeliai, porų dydis 100, 150 arba 200Å.

15

Amfoteriniai jonai - tai junginiai, kurie gali prijungti arba atskelti protonus, t.y., rūgščiuose tirpaluose sudaro kationus, o šarminiuose tirpaluose - anijonus, pavyzdžiui, α -aminorūgštys, betainas arba jo dariniai. Tinkamiausi amfoteriniai jonai - tai glicinas, glutaminas arba betainas (N-trimetilglicinas). Ypač tinkamas yra glicinas.

20

Insulino arba jo darinių izoelektrinis taškas (IET) - tai tokia insulino tirpalo pH reikšmė, kuriai esant ištirpinto insulino kationų ir anionų krūvių suma lygi nuliui. Pavyzdžiui, kiaulės insulino IET yra tarp pH 5,3 ir 5,4 (H. Neurath, K. Baily, Protein Hormones, vol. II/A The Proteins, p. 636). Išsireiškimas "arti izoelektrinio taško" reiškia, kad turimos omenyje tokios pH reikšmės, kurios yra 1 pH vienetu didesnės arba mažesnės už gryninamo insulino IET. Daugiausia yra naudojamos tokios pH reikšmės, kurios yra 0,5 pH vieneto didesnės arba mažesnės už IET.

30

35

Eliuentas turi buferines medžiagas, kurios palaiko pastovią eliuento pH reikšmę. Tinkamos, literatūroje

aprašytos buferinės medžiagos, tai fosfatai, šarminių arba žemės šarminių metalų druskos, pavyzdžiui, natrio citratas arba kalio acetatas, o taip pat ir amonio citratas, acetatas, sulfatas ir chloridas. Be to, i

5 elientų sudėti įeina besimaišantys su vandeniu organiniai tirpikliai, tokie kaip, pavyzdžiui, alkoholiai, ketonai, metilacetatas, dioksanas, dimetilsulfoksidas arba acetonitrilas. Tinkamiausi yra alkoholiai, pavyzdžiui, n- arba izopropanolis,

10 metanolis, etanolis arba metilacetatas.

Tirpiklių, besimaišančių su vandeniu, koncentracija yra ribose nuo 1 iki 90%, dažniausiai nuo 10 iki 60%, dar geriau nuo 10 iki 35%. Buferinių medžiagų koncentracija

15 yra nuo 1 mmol/l iki 2 mol/l, perskaičiavus vandeniui kaip tirpikliui, dažniausiai nuo 25 mmol/l iki 1 mol/l. Amfoterinių jonų koncentracija gali svyruoti plačiose ribose. Tinkamiausi kiekiai yra nuo 10 mmol/l iki 1 mol/l, perskaičiavus vandeniui kaip tirpikliui,

20 geriausia - nuo 20 mmol/l iki 500 mmol/l.

Chromatografinio proceso metu temperatūra yra nuo 0°C iki 50°C, geriausia nuo 10 iki 30°C, ypač gerai nuo 15 iki 20°C. Chromatografijos metu naudojamas slėgis

25 lieka pastoviu. Chromatografijos metu slėgis gali būti įvairus, pavyzdžiui, nuo 5 iki 400 bar, ypač gerai esant slėgiui 20-100 bar.

Kolonėlės užpildymas, chromatografija ir insulino bei jo darinių plovimas elientu atliekamas žinomais, įprastais, techniniais metodais. Kolonėlės užpildymas gryninamu insulino tirpalu atliekamas panaudojant vandeninius-alkoholinius arba, dažnai, grynai vandeninius buferinius tirpalus. Baltymų dalis insulino tirpale

30 sudaro 1-10%, dažniausiai 3%.

35

- Remiantis šiuo išradimu, insulinų praplovimas eliuentu atliekamas esant pastoviai buferinių medžiagų koncentracijai (izokritinė) arba keičiantis buferyje organinio tirpiklio, besimaišančio su vandeniu, daliai.
- 5 Organinio tirpiklio dalis keičiasi taip, kad organinio tirpiklio koncentracija didėja priklausomai nuo eliuento tūrio, t.y., ji dažniausiai yra linijinėje priklausomybėje.
- 10 Po chromatografijos insulinas išskiriamas iš eliuento nusodinant cinku arba kristalinant. Tirpiklis iš tirpalo gali būti pašalinamas nudistiliuojant vakuume ir po to atstatant tirpalo koncentraciją praskiedus vandeniu. Kiekvienu atveju tirpiklio koncentracija
- 15 prieš nusodinimą arba kristalinimą turi būti 10% arba mažiau, kad palaikyti baltymų koncentraciją 50 mg/l. Gautas grynas insulino nuosėdas galima išskirti dekantuojant, centrifuguojant arba filtruojant ir po to džiovinant.
- 20 Metodus, remiantis šiuo išradimu, tinka ne tik analitinei, bet ir preparatyvinei chromatografijai, ypač tuo atveju, jei, remiantis šiuo išradimu, šiuo metodu dirbama naudojant preparatyvinį AESCh įrenginį.
- 25 Išsireiškimas "preparatyvinė chromatografija" suprantamas kaip gryninimo metodas su tikslu gauti gryną produktą ne tik analizei. Gryno produkto kiekis gali svyruoti plačiose ribose, pavyzdžiui, nuo 1 mg iki
- 30 50 kg, dažniausiai nuo 50 mg iki 15 kg.
- Sekančiuose pavyzdžiuose atskirai pateikti šiame išradime aprašyti metodai.

1 PAVYZDYS

5 Buferis A: 0,2 molio amonio sulfato, 0,1 molio gli-
cino, 0,05 molio natrio citrato, pH 5,5,
vien tik vandens tirpalas;

10 Buferis B: 0,1 molio amonio sulfato, 0,1 molio gli-
cino, 0,05 molio natrio citrato, pH
5,5 vanduo/n-propanolis santykiu 1:1;

Sorbentas: NUCLEOSIL C18, 15-25 μ m, sferiniai, porų
dydis 100Å, firma MACHEREY + NAGEL, Düren.

15 Kolonėlės dydis: 40 mm x 250 mm.

20 Kolonėlė užpildoma 3,5 g žmogaus insulino (HI) - gautu
skaidant trifluoracto rūgštimi žmogaus insulino-B30-
ditretbutilo eterį/eteris - baltymo dalis 79,1%.
Insulinas plaunamas eliuentu, aukšto slėgio siurblio
pagalba sumaišant maišymo įrenginyje buferius A ir B;
dėl to susidaro propanolio gradientas nuo 14 iki 20%,
jeigu siurbliu paduodamas 46 ml/min eliuento. Po
frakcionavimo ir kristalinio žmogaus insulino (HI)
išskyrimo, gaunamas produktas, turintis 97% baltymų
25 pagrindinėje frakcijoje (išeiga 88,5%) ir 85,7% baltymų
šalutinėje frakcijoje (išeiga 7,5%). Bendras insulino
kiekis 96%.

2 PAVYZDYS

30

Buferis A: 0,1 molio amonio sulfato, 0,1 molio
glicino, 0,025 molio natrio citrato, pH
5,5, vien tik vandens tirpalas;

35 Buferis B: 0,05 molio amonio sulfato, 0,1 molio
glicino, 0,025 molio natrio citrato, pH
5,5 vanduo/n-propanolis santykiu 1:1;

Sorbentas: NUCLEOSIL C18-P, 15-25 m, sferiniai, porų dydis 100 Å, firma MACHEREY + NAGEL.

Kolonėlės dydis: 40 mm x 250 mm.

5

Aukšto slėgio siurblio pagalba kolonėlė užpildoma 7,0 g žmogaus insulino (HI) (baltymo dalis 86,1%), gautu skaidant žmogaus insulino-di-tret-butilo eterį/eteris, kuris naudojamas 3%-tinio tirpalo buferyje 0,1 mol glicino/druskos rūgšties pavidale, pH 2,8. Po to plaunama, esant slėgiui, eliuentu - aukščiau aprašytais buferiniais tirpalais n-propanolio gradientu. Propanolio koncentracija 60 min. bėgyje išauga nuo 14 iki 17,5%. Po frakcionavimo ir kristalinimo aukščiau minėtais metodais gaunamas produktas, turintis 98,7% baltymo. Išgryninto žmogaus insulino išeiga sudaro 91%, skaičiuojant pagal įvestą insuliną.

15

3 PAVYZDYS

20

Buferis A: 0,1 molio amonio sulfato, 0,1 molio glicino, 0,025 molio natrio acetato, pH 5,5, vien tik vandens tirpalas;

25

Buferis B: 0,05 molio amonio sulfato, 0,1 molio glicino, 0,025 molio natrio acetato, pH 5,5, vanduo/n-propanolis santykiu 1:1.

30

Sorbentas: LICHRESPHER SELECT B, C8, 15-25 µm, porų dydis 60 Å, firma

Kolonėlės dydis: 50 mm x 250 mm.

35

Kolonėlė užpildoma 10 g reakcijos mišinio tirpalu, i kurio sudėty įeina peramidintas kiaulių insulinas su tripsinu, ištirpinti 200 ml buferio - 0,1 molio glicino/druskos rūgšties, pH 2,8. Plaunama 120 minučių

bėgyje eliuentu, esant padavimo greičiui 40 ml/min. ir didėjant propanolio koncentracijai nuo 14 iki 30%, po to baltymai išskiriami į atskirus komponentus. Po kristalinimo arba nusodinimo ir džiovinimo, kaip
5 pagrindinė frakcija gaunamas žmogaus insulino-B30-di-tret-butiltreonino eteris/eteris, kurio grynumo laipsnis daugiau kaip 97% ir išeiga 93%, skaičiuojant pagal įvestą insuliną.

10 4 PAVYZDYS

Buferis A: 0,1 molio natrio chlorido, 0,1 molio glicino, 0,025 molio natrio acetato, pH 5,5, vien tik vandens tirpalas;

15

Buferis B: 0,05 molio natrio chlorido, 0,1 molio glicino, 0,025 molio natrio acetato, pH 5,5, vanduo/n-propanolis santykiu 1:1.

20 Sorbentas: ZORBACH PRO 10, C8, 10 μ m, firma Du Pont.

Kolonėlės dydis: 5 cm x 25 cm.

7,5 g HI, gauto skaidant trifluoracto rūgštimi žmogaus
25 insulino B30-di-tret-butiltreonino eterį/eteris, ištirpinto 100 ml 0,1 molio glicino/druskos rūgšties tirpalo, plaunama eliuentu panaudojant siurbli ir esant padavimo greičiui 80 ml/min. Buferio B koncentracija 60 minučių bėgyje padidėja iki 18-25%, sulaikymo laikas
30 - apie 37 minutes. Po kristalinimo ir džiovinimo, iš pagrindinės frakcijos galima išskirti iki 96,8% HI, skaičiuojant pagal įvestą kiekį, grynumo laipsnis mažiau kaip 50%.

5 PAVYZDYS

5 Buferis A: 0,2 molio natrio sulfato, 0,1 molio gli-
cino, 0,03 molio amonio acetato, pH 5,5,
10%-tinis metilacetatas;

Buferis B: 0,05 molio natrio sulfato, 0,1 molio gli-
cino, 0,03 molio amonio acetato, pH 5,5,
20%-tinis metilacetatas.

10 Sorbentas: KROMASIL C8, 13 m, porų dydis 100A, firma
EKA NEBEL.

Kolonėlės dydis: 5 x 25 cm.

15 Stambių raguočių insulinas įvedamas į kolonėlę (8 g/l
kolonėlės tūrio), panaudojant buferį, susidedantį iš
0,1 molio glicino/druskos rūgšties, ir balansuojant
30%-tiniu buferio B tirpalu. Buferio B koncentracija
20 90 minučių bėgyje padidėja iki 80% (=18% metilacetato).
Stambių raguočių insulinas, išplautas eliuentu po
65 minučių, grynumo laipsnis pagrindinėje frakcijoje
daugiau kaip 97,5% (išeiga 63,5%), nusodinamas cinko
chloridu, prieš tai praskiedus vandeniui. Bendras
25 baltymų kiekis 92,5%.

6 PAVYZDYS

30 Buferis A: 0,1 molio amonio sulfato, 0,1 molio gli-
cino, 0,025 molio natrio acetato, pH 5,5,
5% n-propanolio;

Buferis B: 0,05 molio amonio sulfato, 0,1 molio gli-
cino, 0,025 molio natrio acetato, pH 5,5,
35 vanduo/n-propanolis santykiu 1:1.

Sorbentas: KROMASIL C₈, 13 μm. Porų dydis 100Å, firma EKA NEBEL.

Kolonėlės dydis: 5 cm x 25 cm.

5

Kolonėlė užpildoma 4 g žmogaus insulino (=8 g/l), gauto skaidant trifluoracto rūgštimi žmogaus insulino-B30-ditret-butiltreonino eterį/eteris, grynumo laipsnis apie 92%. Buferio gradientas 18-25% 90 minučių bėgyje išplauna žmogaus insuliną, po 45 minučių insulino grynumo laipsnis pagrindinėje frakcijoje daugiau kaip 97% (išeiga 91,8%), o šalutinėje frakcijoje - 80,5% (išeiga 4,7%).

10

15

7 PAVYZDYS

Buferis A: 0,1 molio amonio sulfato, 0,1 molio glicino, 0,026 molio natrio acetato, pH 5,5, 10% n-propanolio;

20

Buferis B: 0,05 molio amonio sulfato, 0,1 molio glicino, 0,025 molio natrio acetato, pH 5,5, vanduo/n-propanolis santykiu 1:1.

25

Sorbentas: KROMASIL C₈, 13 μm, porų dydis 100Å, firma EKA NEBEL.

Kolonėlės dydis: 10 cm x 40 cm.

30

I kolonėlę įvedama 18 g kiaulių insulino, esančio 1,8 litro buferio, pagaminto iš 0,1 molio glicino/druskos rūgšties, pH 3,0, su 5% n-propanolio. Gradientas 70 minučių bėgyje padidina buferio kiekį nuo 9% (=13,6% n-propanolio) iki 11% (=14,4% n-propanolio).

35

Kiaulių insulinas plaunamas eliuentu po 50 minučių, baltymo kiekis pagrindinėje frakcijoje daugiau kaip 98%

(išeiga 89%). Bendras baltymo kiekis 96,8%, skaičiuojant pagal įvestą.

8 PAVYZDYS

5

Buferis A: 0,2 molio amonio chlorido, 0,1 molio glicino, 0,025 molio natrio citrato, 5% n-propanolio, pH 5,5.

10 Buferis B: kaip ir A buferis, tik papildomai pridėta 50% n-propanolio.

Sorbentas: KROMASIL C8, 13 μ m. Porų dydis 100Å, firma EKA NOBEL, Švedija.

15

Kolonėlės dydis: 50 mm x 250 mm.

4 g gentechniškai gauto žmogaus insulino (89,5% baltymo) ištirpinama 0,1 molio glicino buferyje, pH 3,0; gautas 2% baltymo tirpalas aukšto slėgio siurbliu paduodamas į kolonėlę. Plaunama eliuentu linijiniais gradientais nuo 13 iki 16% n-propanolio 70 minučių bėgyje, esant padavimui 80 ml/min. Po frakcionavimo ir kristalinimo, pagrindinėje frakcijoje gaunamas žmogaus insulinas, turintis 98% baltymo, išeiga 93%. Bendras baltymo kiekis 98%, skaičiuojant pagal įvestą kiekį.

25

9 PAVYZDYS

30 Buferis A: 0,2 molio amonio sulfato, 0,1 molio glicino, 0,025 molio amonio citrato, 5% etanolio, pH 5,5.

Buferis B: kaip ir buferis A, tik pridėta 50% etanolio.

35

Sorbentas: KROMASIL C₈, 10 μ m, porų dydis 100Å, firma EKA NEBEL, Švedija.

Kolonėlės dydis: 50 mm x 250 mm.

250 ml glicino buferio, pH 3,0, ištirpinama 4,5 g
 5 gentechniškai gauto žmogaus insulino (86,3% baltymo) ir
 po to siurbliu paduodama į kolonėlę. Baltymo chromato-
 grafijai, dviejų aukšto slėgio siurblių pagalba,
 sukuriamas linijinis gradientas iš abiejų A ir B
 buferių. Plaunama eliuentu, praėjus 100 minučių, esant
 10 33% etanolio koncentracijai ir pastoviam 80 ml/min.
 padavimui. Po frakcionavimo ir kristalinimo pagrin-
 dinėje frakcijoje gaunama žmogaus insulinas, turintis
 96% baltymo, bendras baltymo kiekis 93%, skaičiuojant
 pagal įvestą produktą.

15

10 PAVYZDYS

Buferis A: 0,2 molio amonio chlorido, 0,1 molio
 glicino, 0,025 molio natrio citrato, 10%
 20 metilacetato, pH 5,5.

Buferis B: tos pačios druskų koncentracijos, kaip ir
 A buferyje, tik 20% metilacetato.

25 Sorbentas: KROMASIL C₈, 10 μm, porų dydis 100Å, firma
 EKA NEBEL, Švedija.

Chromatografijai ištirpinama 200 ml vandeninio glicino
 buferio 4,6 g nevalyto žmogaus insulino, gauto
 30 perdirbant gentechniškai sukurtą insuliną ir po to
 siurbliu paduodama į AESCh kolonėlę, kurios dydis 50 x
 250 mm. Kolonėlės medžiaga išbalansuojama A ir B
 buferiais dviejų aukšto slėgio siurblių pagalba iki
 metilacetato koncentracijos 13%. Po to, žmogaus
 35 insulinas plaunamas 90 min. bėgyje eliuentu, esant
 linijiniam gradientui 13-17% metilacetato. Pagrindinis
 produktas išskiriamas kristalinant iš eliuato. Gaunama

3,8 g žmogaus insulino, kuriame 96% baltymo. Bendras baltymo kiekis 93%, skaičiuojant pagal pradinę medžiagą.

5 11 PAVYZDYS

10 Buferis A: 0,2 molio amonio sulfato, 0,1 molio betaino, 0,05 molio citrinos rūgšties, pH 5,5, pašarminus natrio šarmu (vien tik vandeninis tirpalas);

15 Buferis B: 0,1 molio amonio sulfato, 0,1 molio betaino, 0,05 molio citrinos rūgšties, pH 5,5, pašarminus natrio šarmu (vanduo/izopropanolis santykiu 1:1).

Sorbentas: NUCLEOSIL C18, 15-25 μ m, sferiniai, 100Å.

20 Kolonėlė: 40 mm x 250 mm.

Padavimas: 45 ml/min.

25 Kolonėlė užpildoma 3 g (79% baltymo) žmogaus insulinu, gautu skaidant žmogaus insulino-di-tret-butilo eterį/eteris. Užpildoma 3%-tiniu tirpalu buferyje, kuris paruoštas iš 0,1 molio betaino/druskos rūgšties, pH 3,0, aukšto slėgio siurblio pagalba. Po to plaunama eliuentu - aukščiau minėta buferių sistema, esant 44% B buferio. Sulaikymo laikas maždaug 35 minutės. Po 30 frakcionavimo, pagrindinėje frakcijoje gaunama 98,1% žmogaus insulino, išeiga 80,5%. Bendras baltymo kiekis - 90,5%.

12 PAVYZDYS

35

Buferis A: 0,1 molio amonio sulfato, 0,1 molio gliutamino rūgšties, 0,05 molio citrinos rūgš-

ties, pH 5,45, pašarminus natrio šarmu
(vien tik vandeninis tirpalas);

5 Buferis B: 0,1 molio amonio sulfato, 0,1 molio gliu-
tamino rūgšties, 0,05 molio citrinos
rūgšties, pH 5,5, pašarminus natrio šarmu,
(vanduo:n-propanolis = 1:1).

10 Sorbentas: NUCLEOSIL C18-P, 15-25 μ m, sferiniai, 100Å.

Kolonėlė: 50 mm x 250 mm.

Padavimas: 60 ml/min.

15 Kolonėlė užpildoma 6 g žmogaus insulino (73% baltymo),
gauto skaidant žmogaus insulino-di-tret-butilo eterį/
eteris. Užpildoma 3%-niu tirpalu 0,1 molio acto
rūgšties, pH 3,0, aukšto slėgio siurblio pagalba. Po to
plaunama eliuentu - aukščiau minėta buferių sistema,
20 esant 25-28% B buferio gradientui. Sulaikymo laikas
maždaug 25 minutės. Po frakcionavimo pagrindinėje
frakcijoje gaunama 98,6% žmogaus insulino, išeiga 65%.
Bendras baltymo kiekis 88,5%.

25 13 PAVYZDYS

30 Buferis A: 0,15 molio amonio sulfato, 0,1 molio tri-
etilamino, pH 6,5, parūgštinus sieros
rūgštimi (vien tik vandeninis tirpalas);

Buferis B: 0,08 molio amonio sulfato, 0,05 molio
trietilamino, pH 6,5, parūgštinus sieros
rūgštimi (vanduo: 2-propanolis = 1:1).

35 Sorbentas: NUCLEOSIL C18-P, 15-25 μ m, sferiniai, 100Å.

Kolonėlė: 50 mm x 250 mm.

Padavimas: 60 ml/min.

Užpildžius kolonėlę 5 g žmogaus insulino, gauto
 5 trifluoracto rūgštimi skaidant insulino-di-tret-
 butiltreonino eterį/eteris, 3% tirpalu, plaunama
 eliuentu, esant buferio B koncentracijai nuo 32 iki
 42%. Sulaikymo laikas - 40 minučių. Po frakcionavimo
 ir kristalinimo, pagrindinėje frakcijoje gaunama 72%,
 10 grynumo laipsnis 92,7%. Bendras baltymo kiekis 76%,
 skaičiuojant pagal įvestą kiekį.

14 PAVYZDYS

15 Buferis A: 0,1 molio citrinos rūgšties, 0,2 molio
 amonio sulfato, pH 2,5, parūgštinus
 druskos rūgštimi, vien tik vandeninis
 tirpalas;

20 Buferis B: 0,1 molio citrinos rūgšties, 0,1 molio
 amonio sulfato, pH 2,5, parūgštinus
 druskos rūgštimi, vanduo: n-propanolis =
 1:1.

25 Sorbentas: NUCLEOSIL C18, firma MACHEREY + NAGEL

Kolonėlė: 40 x 250 mm.

Padavimas: 45 ml/min.

30

Užpildžius kolonėlę 3 g žmogaus kilmės insulino, gauto
 trifluoracto rūgštimi skaidant žmogaus insulino-di-
 tret-butiltreonino eterį/eteris, 3% tirpalu 0,1 molio
 glicino buferyje, pH 3,0, plaunama eliuentu, esant
 35 buferio B koncentracijai nuo 34 iki 35%. Sulaikymo
 laikas - 45 minutės. Po frakcionavimo, kristalinimo ir
 džiovinimo išskiriama 57% pagrindinėje frakcijoje,

skaičiuojant pagal įvestą kiekį (grynumo laipsnis 94,8%) ir 16% šalutinėje frakcijoje (grynumo laipsnis 84%).

5 15 PAVYZDYS

10 Buferis A: 0,1 molio citrinos rūgšties, 0,2 molio amonio sulfato, pH 3,5, parūgštinus druskos rūgštimi, vien tik vandeninis tirpalas;

15 Buferis B: 0,1 molio citrinos rūgšties, 0,1 molio amonio sulfato, pH 3,5, parūgštinus druskos rūgštimi, vanduo:n-propanolis = 1:1.

Sorbentas: NUCLEOSIL C18, firma MACHEREY + NAGEL

Kolonėlė: 40 x 250 mm

20 Padavimas: 45 ml/min.

25 Kolonėlė užpildoma kaip ir 14 pavyzdyje. Sulaikymo laikas - apie 40 minučių. Po frakcionavimo, kristalinimo ir džiovinimo gaunama 51% pagrindinėje frakcijoje, skaičiuojant pagal įvestą žmogaus insuliną, grynumo laipsnis 97,5%, ir 4% šalutinėje frakcijoje, grynumo laipsnis 68%.

30 16 PAVYZDYS

35 Buferis A: 0,1 molio Tris, 0,1 molio glicino, 0,1 molio amonio chlorido, pH 8,5, parūgštinus druskos rūgštimi, vien tik vandeninis tirpalas;

Buferis B: 0,1 molio Tris, 0,1 molio glicino, 0,1 molio amonio chlorido, pH 8,5, parūgštinus druskos rūgštimi vanduo: n-propanolis = 1:1.

5 Sorbentas: KROMASIL C8, 13 μ m, 100Å.

Kolonėlė: 50 mm x 250 mm

Padavimas: 60 ml/min.

10

Kolonėlė, subalansuota 33%-tiniu B buferiu, užpildoma 6 g žmogaus insulino, gauto skaidant trifluoracto rūgštimi (žr. 14 pavyzdį), 3% tirpalu 0,1 molio Tris buferyje, pH 8,5. Po 35 minučių plaunama eliuentu. Po 15 funkcionavimo ir kristalinimo pagrindinėje frakcijoje gaunama 96,6% žmogaus insulino, kurio išeiga 86%. Bendras baltymo kiekis - 95%.

17 PAVYZDYS

20

Buferis A: 0,1 molio amonio chlorido, 0,025 molio citrinos rūgšties, pH 5,5, pašarminus amoniaku, 50% (tūrio) n-propanolio.

25 Sorbentas: KROMASIL C8, 13 μ m, 100Å.

Kolonėlė: 50 mm x 250 mm.

Srautas: 60 ml/min.

30

Kolonėlė užpildoma, kaip jau buvo aprašyta, 6 g žmogaus insulinu, gautu skaidant trifluoracto rūgštimi (žr. 14 pavyzdį). Gradientas nusistato 60 min. bėgyje, esant B buferio kiekiui 21-25%. Po to insulinas plaunamas eliuentu, sulaikymo laikas - 40 minučių. Pagrindinėje 35 frakcijoje yra 91%, skaičiuojant pagal įvestą produktą, grynumo laipsnis 97,5%. Bendras baltymo kiekis - 96%.

18 PAVYZDYS

5 Buferis A: 0,1 molio kalio chlorido, 0,025 molio citrinos rūgšties, pH 5,5, pašarminus kalio šarmu, 5% (tūrio) n-propanolio.

10 Buferis B: 0,1 molio kalio chlorido, 0,025 molio citrinos rūgšties, pH 5,5, pašarminus kalio šarmu, 50% (tūrio) n-propanolio.

Sorbentas: KROMASIL C8, 13 μ m, 100Å.

15 Kolonėlė: 50 mm x 250 mm

Srautas: 60 ml/min.

20 Užpildymas ir gradientas kaip 17 pavyzdyje. Plovimas eluentu po 35 minučių. Pagrindinėje frakcijoje yra 90% žmogaus insulino, skaičiuojant pagal įvestą kiekį, grynumo laipsnis 96,5%. Bendras baltymo kiekis - 93%.

19-24 PAVYZDŽIAI

25 Pavyzdžiuose 19-24 chromatografija atliekama tomis pačiomis sąlygomis kaip ir 14 pavyzdyje. Keičiasi tik buferis arba amfoterinių jonų koncentracija.

19 PAVYZDYS

30

Buferis A: 0,15 molio amonio sulfato, 0,1 molio trietilamino, pH 7,0, parūgštinus sieros rūgštimi.

35 Buferis B: 0,08 molio amonio sulfato, 0,05 molio trietilamino, pH 7,0, parūgštinus sieros rūgštimi.

Rezultatas: pagrindinės frakcijos grynumas 95,2%,
pagrindinės frakcijos išeiga 67%.

5 20 PAVYZDYS

Buferis kaip 16 pavyzdyje, tik be 0,1 molio glicino.

10 Rezultatas: pagrindinės frakcijos grynumas 96,1%,
pagrindinės frakcijos išeiga 65%,
šalutinės frakcijos išeiga 25%.

21 PAVYZDYS

15 Buferis kaip 15 pavyzdyje, bet papildomai įvesta
0,1 molio glicino.

20 Rezultatas: pagrindinės frakcijos grynumas 96%, pag-
rindinės frakcijos išeiga 66%, šalutinės
frakcijos išeiga 6%.

22 PAVYZDYS

25 Buferis A: 0,1 molio amonio chlorido, 0,025 molio
citrinos rūgšties, pH 4,5, pašarminus
amoniaku, 5% (tūrio) n-propanolio, 0,1 mo-
lio glicinbetaino.

30 Buferis B: kaip ir buferis A, bet papildomai 50% n-
propanolio.

Rezultatas: pagrindinės frakcijos išeiga 88%, šalu-
tinės - 6%, pagrindinės frakcijos grynumas
- 98,1%.

23 PAVYZDYS

Buferis, kaip 22 pavyzdyje, bet pH 5,4 ir 0,1 molio glicino vietoj glicinbetaino.

5

Rezultatas: pagrindinės frakcijos grynumas 97,9%, pagrindinės frakcijos išeiga 92%, šalutinės - 8%.

24 PAVYZDYS

10

Buferis kaip 13 pavyzdyje, bet pH 6,0 ir papildomai 0,1 molio glicino.

15

Rezultatas: pagrindinės frakcijos grynumas 94,3%,
pagrindinės frakcijos išeiga 77%,
šalutinės - 13%.

25 PAVYZDYS

20

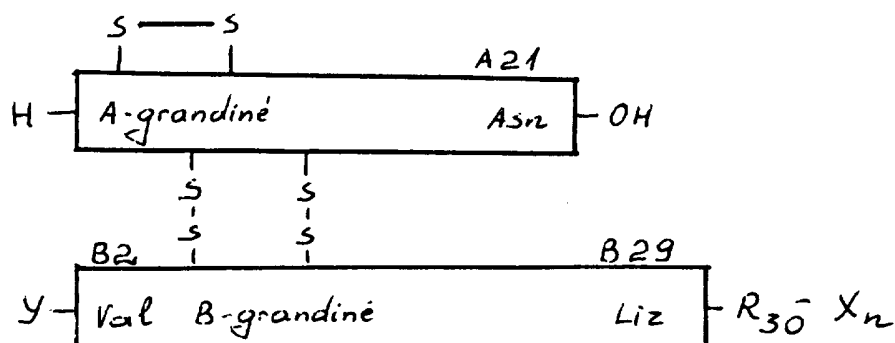
1 Lentelėje pateiktos insulinų išeigos ir grynumas priklausomai priklausomai nuo pH reikšmių ir/arba eliuate esančių amfoterinių jonų.

1 Lentelė

Pavyzdžio Nr.	pH reikšmė	Amfoteriniai jonai	Pagrindinės frakcijos grynumas (%)	Išeiga (%)	
				Pagrindinė frakcija	Šalutinė frakcija
14	2,5	-	94,8	57	16
15	3,5	-	97,5	51	4
13	6,5	-	92,7	72	4
19	7,0	-	95,2	67	-
20	8,5	-	96,1	65	25
17	5,5	-	97,5	91	5
18	5,5	-	96,5	90	3
21	3,5	glicinas	96,0	66	6
22	4,5	glicin- betainas	98,1	88	6
23	5,4	glicinas	97,9	92	8
8	5,5	glicinas	98,0	93	5
16	8,5	glicinas	96,6	86	9
24	6,0	glicinas	94,0	77	13

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Insulino ir/arba jo darinių chromatografinio gryninimo ant lipofiliškai modifikuoto silikagelio
5 metodas, panaudojant vandeninius buferinius tirpalus, į kurių sudėtį įeina su vandeniu besimaišantys organiniai tirpikliai, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad naudoja buferinius tirpalus, kuriuose ištirpinti amfoteriniai jonai arba tirpalo pH reikšmė yra artima
10 gryninamo insulino arba jo darinių izoelektriniam taškui ir dalyvauja amfoteriniai jonai.
2. Metodas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad tirpiklių mišinio pH reikšmė yra iki 1 pH
15 vieneto aukštesnė arba žemesnė už gryninamo insulino arba jo darinių izoelektrinį tašką.
3. Metodas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad tirpiklių mišinio pH reikšmė yra iki
20 0,5 vieneto žemesnė arba aukštesnė už gryninamo insulino izoelektrinį tašką.
4. Metodas pagal vieną ar kelis punktus iš 1-3 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad amfoteriniais
25 jonais naudoja α -aminorūgštį arba betainą.
5. Metodas pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad amfoteriniais jonais naudoja gliciną, gliutamino rūgštį arba glicinbetainą.
30
6. Metodas pagal vieną ar kelis punktus iš 1-5 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad naudojami insulino dariniai, kurių bendra formulė (I),



kurioje

R_{30} - genetiškai koduotos L-aminorūgšties liekana,

- 5 X - hidroksigrupė, fiziologiškai inertinė bazinio tipo organinė grupė C_1-C_{50} ; genetiškai koduota L-aminorūgštis, turinti gale laisvą karboksilo funkcinę grupę, tokią kaip, pavyzdžiui, esterio, amido, laktono grupę arba redukuotą iki CH_2OH grupę.
- 10

n - sveikas skaičius nuo 0 iki 10,

Y - vandenilis arba L-fenilalaninas,

15

A- ir B-grandinės - žmogaus arba gyvulinės kilmės insulino grandinės.

7. Metodas pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad (I) formulėje

20

R_{30} - L-alaninas arba L-treoninas ir

X - viena arba kelios L-aminorūgštys, priklausančios L-arginino, L-lizino arba L-fenilalanino grupei.

25

8. Metodas pagal vieną arba kelis punktus iš 1-7 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad naudoja įrenginius, skirtus preparatyvinei aukšto efektyvumo skysčių chromatografijai (AESCh).