



[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU**
UTLÄGGNINGSSKRIFT

73239

C (45) Patentti myönnetty
Patent rekisteröity 10.08.1987

(51) Kv.IK./Int.Cl.⁴ C 12 P 21/02, C 07 K 7/40

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patentihakemus - Patentansökning	830782
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	09.03.83
(23) Alkuperä - Giltighetsdag	10.08.82
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	09.03.83
(44) Nähtävöksiapanon ja kuuljulkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	29.05.87
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan	PCT/DK82/00074
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus - Begärd prioritet	10.08.81
Tanska-Danmark(DK) 3545/81	

(71) Nordisk Insulinlaboratorium, Niels Steensens Vej 1, Gentofte,
Tanska-Danmark(DK)

(72) Finn Hede Andresen, Hillerød, Per Balschmidt, Espergaerde,
Kim Ry Hejnaes, Lyngby, Tanska-Danmark(DK)

(74) Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab

(54) Menetelmä insuliini johdannaisen valmistamiseksi -
Förfarande för framställning av ett insulinderivat

(57) Tiivistelmä

Ihmisen insuliinia valmistetaan käsittelemällä sian insuliinituotetta, mieluummin raakaa sian insuliinia, karboksipeptidaasi A:lla tai vastaavalla entsyymillä desalanini-B30-insuliinituotteen valmistamiseksi, joka kondensoidaan, puskuria lisäämättä, enintään 30 minuutin ajan L-treoniini-alkyyliesterin kanssa alemman alkanolin ja veden seoksessa, joka sisältää trypsiiniä tai sen kaltaista entsyymiä, pH-arvossa noin 5,5 - noin 7,5 insuliini-alkyyliesterin muodostamiseksi, joka hydrolysoidaan pH-arvossa noin 8,5 - noin 10,5 entsyymiä lisäämättä ja ilman NH_4^+ - ja HCO_3^- -ioneja.

(57) Sammandrag

Mänskligt insulin framställs genom behandling av en svininsulinprodukt, företrädesvis rått svininsulin, med karboxipeptidas A eller ett motsvarande enzym, för att bilda en desalanin-B30-insulinprodukt, vilken kondenseras, utan tillförsel av buffert, under en tid av upp till 30 minuter med en L-treonin-alkylester, i en blandning av en lägre alkanol och vatten innehållande trypsin eller ett därmed besläktat enzym, vid ett pH-värde av ca 5,5 - ca 7,5 för att bilda en insulin-alkylester, vilken hydrolyseras vid ett pH-värde av ca 8,5 - ca 10,5 utan tillsats av enzym och i frånvaro av NH_4^+ - och HCO_3^- -joner.

Menetelmä insuliini johdannaisten valmistamiseksi
Förfarande för framställning av ett insulinderivat

Tämä keksintö koskee uutta menetelmää ihmisen insuliini-tuotteen valmistamiseksi, joka sopii terapeuttisten insuliini-valmisteiden valmistamiseksi, jonka menetelmän mukaan sian insuliinituotetta käsitellään karboksipeptidaasilla A tai vastaavalla entsyymillä desalaniini-B30-insuliinituotteen valmistamiseksi, joka sen jälkeen kondensoidaan L-treoniini-alkyyliesterin kanssa trypsiinin tai sen kaltaisen entsyymin ja orgaanisen liuottimen läsnäollessa, minkä jälkeen muodostunut insuliiniesteri hydrolysoidaan ihmisen insuliiniksi.

Insuliini on välttämätön lääke hoidettaessa sokeritautia. Olisi luonnollista hoitaa ihmisiä ihmisalkuperää olevasta insuliinista valmistetuilla terapeuttisilla valmisteilla. Sokeritautisten lukumäärä ja yksittäinen insuliinitarve on epäsuhteessa saatavissa olevaan raaka-ainemäärään (ihmisen haima).

Käytännön syistä käytetään sen johdosta naudan ja sian insuliinista valmistettuja terapeuttisia valmisteita. Nämä insuliinit aikaansaavat kuitenkin vasta-aineiden muodostumisen suuremmassa tai pienemmässä määrin ihmisen kehossa, mikä vähentää jälkeenseuraavan insuliinihoidon tehokkuutta.

Tämän haitan oletetaan johtuvan osittain naudan ja sian insuliinissa olevista epäpuhtauksista, osittain sen vieraasta luonteesta, sillä naudan insuliinin aminohapposekvenssi eroaa ihmisen insuliinista asemien A8, A10 ja B30 suhteen, kun taas sian insuliini eroaa ihmisen insuliinista vain B30-aseman suhteen.

Vasta-aineiden muodostumiseen liittyvät ongelmat ovat oleellisesti vähentyneet sellaisten terapeuttisten valmisteiden kehittämisen myötä jotka on valmistettu kromatografisesti puhdistetusta naudan ja sian insuliinista. Vasta-aineiden muodostusta voi kuitenkin vielä esiintyä. Oletetaan, että tämä epäkohta voidaan eliminoida käyttämällä terapeuttisia valmisteita, jotka on valmistettu insuliinista, jolla on sama aminohapposekvenssi kuin ihmisen insuliinilla.

On tunnettua valmistaa insuliinia kemiallisesti, vrt. US-patenttijulkaisua 3,903,068 ja Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 357, 759-767 (1976).

Nämä menetelmät käsittävät sian desoktapeptidi-(B23-30) insuliinin kondensoimisen ihmisen insuliinin asemia B-23-30 vastaavan synteettisen oktapeptidin kanssa. Ensimmäisessä menetelmässä suoritetaan kuitenkin alkalinen hydrolyysi, johon liittyy epäedullisia sivureaktioita. Toinen prosessi käsittää ei-spesifisen reaktion, joka aiheuttaa monia sivureaktioita ja joka vaatii monimutkaisia puhdistusmenetelmiä. Näin ollen eivät nämä menetelmät ole sopivia käytettäväiksi teollisessa mittakaavassa.

US-patenttijulkaisussa 3,276,961 on lisäksi esitetty menetelmä ihmisen insuliinin valmistamiseksi muista eläininsuliineista entsyymin, esim. karboksipeptidaasin A tai trypsiinin vaikutuksen avulla, treoniinin läsnäollessa.

Tällä tunnetulla menetelmällä ei kuitenkaan ole mahdollista valmistaa suurempia määriä ihmisen insuliinia. Tämä johtuu ilmeisesti siitä, että trypsiini ja karboksipeptidaasi A hydrolysoivat sekä lysyyli-alaniini-peptidi-sidoksen (B29-B30) että insuliinin muita asemia työskentelyolosuhteissa. Trypsiini hydrolysoi mieluummin arginyyli-glysiini-peptidi-sidoksen (B22-B23) kuin lysyyli-alaniini-sidoksen (B29-B30). Karboksipeptidaasi A ei kuitenkaan pysty lohkaisemaan pois pelkästään alaniinia B-ketjun C-pääteasemassa lohkaismatta pois myös asparagiinia A-ketjun C-pääteasemassa. On myöhemmin osoittautunut että tietty ehto, ts. reaktion suorittaminen ammoniumbikarbonaattipuskuriliuoksessa, on välttämätön asparagiinin vapautumisen estämiseksi, vrt. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 359, 799-802 (1978). Lisäksi peptidin muodostus voi tuskin olla merkittävä sillä hydrolyysi-reaktion nopeus on peptidisynteesin reaktionopeutta suurempi työskentelyolosuhteissa.

Lisäksi on julkaisussa Nature Vol. 280, 2. elokuuta 1979, 412-413, Biochem. & Biophys. Res. Commun., 29. tammikuuta 1980, 92(2), 396-402, ja tanskalaisessa patenttihakemuksessa

1556/80 (kaikki Morihara et al) kuvattu menetelmä B-30 aminohapon vaihtamiseksi, jonka mukaan sian insuliinin käsitteily karboksipeptidaasi A:lla, johon on lisätty inhibiittoria (di-isopropyyli-fluorofosfaattia) 25°C:ssa 8 tunnin ajan ammoniumbikarbonaattipuskurin läsnäollessa antaa desalaniini-insuliinin (DAI), joka eristetään. Sen jälkeen suoritetaan kytkentäreaktio lisäämällä trypsiinin liuos 0,5 M boraattipuskuriliuoksessa ja tosyyli-L-fenylyli-alaniini-kloorimetyyli-ketonia (TPCK) DAI:n ja treoniini-butyyliesterin (Thr-OBu^t) liuokseen liuottimessa, joka sisältää suuren konsentraation (noin 60%) omaavaa orgaanista liuotinseosta joka koostuu DMF:n ja etanolin seoksesta, minkä jälkeen reaktion annetaan edetä 37°C:ssa 20-48 tuntia (B30-Thr-OBu^t)-sian insuliinin muodostamiseksi, joka eristetään. Lopuksi lohkaistaan butyyliesterisuojarahmā pois trifluorietikkahapolla anisolin läsnäollessa.

Tutkimukset ovat kuitenkin osoittaneet, että viimeksi mainittu tunnettu menetelmä antaa ihmisen insuliinituotteen, joka on sopimaton terapeuttisten valmisteiden valmistamiseksi, koska se sisältää entsyymiepäpuhtauksia, minkä johdosta se on sopimaton käytettäväksi tarvittavien, pidennetyn aktiiviteetin omaavien farmaseuttisten valmisteiden valmistamiseksi. Tuote on lisäksi mutageeninen "Ames"-kokeessa vasta kohtana ihmisen insuliiniin ja sian insuliiniin, joka on valmistettu ihmis- vast. sianalkuperää olevasta haimasta. Lisäksi se sisältää epäpuhtauksia, jotka ovat vaikeasti poistettavissa tavallisesti käytetyillä menetelmillä.

Suomalaisesta patenttihakemuksesta 81 0385 tunnetaan nk. transpeptidointimenetelmä, jossa insuliinin B30-asemassa oleva aminohappo vaihdetaan yhdessä vaiheessa toiseksi aminohapoksi. Tällä tunnetulla transpeptidointimenetelmällä muutetaan esimerkiksi sian insuliini suoraan ihmisen insuliiniksi yhdessä vaiheessa, erilaisella menetelmällä kuin tässä hakemuksessa on esitetty.

Julkaisusta Peptides, 1980, Proceedings of the 16th European Peptide Symposium Helsingør, DK, Aug. 31 - Sept. 6,

1980, Kopenhagen 1981, Ed. K. Brunfeldt, Trypsin catalyzed peptide synthesis: Modification of the B-chain C-terminal region of insulin, Gattner H-G et al. s. 372-377 on tunnettua yhdistää desalaniini-B30-insuliini (DAI) Thr-OMe:n kanssa valmistettaessa ihmisen insuliiniesteriä. Reaktioväliaineena käytetään 60%:ista dimetyyliformamidia (DMF). Taulukosta 3, sivulta 376 käy ilmi, että dimetyyliformamidilla, butaanidioli-1,4:llä, etyleeniglykolilla ja dimetyylisulfoksidilla on edullinen vaikutus julkaisussa kuvatun trypsiinikatalysoidun liittymisreaktion saantoon, mitävastoin isopropanolilla, joka on ainoa alempialkanoli taulukossa 3, saadaan heikko saanto. Tässä tunnetussa menetelmässä käytetyt liuotimet, esimerkiksi dimetyyliformamidi, on vaikea kokonaan poistaa reaktioseoksesta. Sen vuoksi on aina olemassa riski, että tällä tunnetulla menetelmällä valmistetussa lopputuotteessa on jäljellä liuotinjäämiä, mikä muodostaa tietyn terveysriskin potilaalle. Esimerkiksi DMF on mutageeninen Ames-kokeessa.

Nyt on todettu, että on mahdollista valmistaa uudella menetelmällä erittäin puhdas ihmisen insuliinituote, jossa ei ole edellä mainittuja, tunnetuilla menetelmillä valmistettuihin ihmisen insuliinituotteisiin liittyviä epäkohtia.

Keksinnön mukaisesti suoritetaan desalaniini-B30-insuliinin (DAI) kytkentä L-treoniini-alkyyliesteriin käyttäen tiettyä järjestystä sekoitettaessa molemmat reaktiokomponentit, entsyymi ja reaktioväliaine käyttämättä puskuria. Tällöin kytkentäreaktio päättyy hämmästyttävän lyhyessä ajassa. Reaktioväliaineessa käytetään alempialkanolin ja veden seosta, jonka pH on noin 5,5-7,5. Näin valmistettu insuliiniesteri muutetaan sitten ihmisen insuliiniksi lievällä menetelmällä, toisaalta valitsemalla esterin alkyyliosaa sopivasti, toisaalta suorittamalla hydrolyysi vesipitoisessa väliaineessa, jonka pH-arvo on alueella 8,5-10,5. Niinpä vältetään entsyymin, trifluorietikkahapon ja anisolin lisäämisestä.

Keksinnön mukaiselle menetelmälle on näin ollen tunnusomaista, että desalaniini-B30-insuliinituote suspendoidaan

alempialkanoliin, suspensioon sekoitetaan L-treoniini-alkyyliesterin ja trypsiinin tai sen kaltaisen entsyymin seos vedessä, jonka pH on säädetty arvoon noin 5,5 - noin 7,5 puskuria lisäämättä, minkä jälkeen saadun seoksen annetaan olla enintään 30 minuuttia ja insuliiniesterin hydrolyysi suoritetaan vesipitoisessa väliaineessa pH-arvossa, joka on alueella noin 8,5 - noin 10,5.

Kun keksinnön mukainen menetelmä suoritetaan suuressa mittakaavassa, kuten teollisessa mittakaavassa, käyttäen esim. 50 g tai enemmän insuliini-lähtötuotetta, keksinnön edullinen suoritusmuoto käsittää trypsiinin tai sen kaltaisen entsyymin liuottamisen erikseen osaan L-treoniini-alkyyliesterin liuosta vedessä, desalaniini-B30-insuliinituotteen suspension lisäämisen loppuosaan L-treoniini-alkyyliesterin liuosta vedessä, saadun seoksen lämpötilan ja pH-arvon säätämisen ja sen jälkeen trypsiinin tai sen kaltaisen entsyymin liuoksen lisäämisen, joka on valmistettu erikseen osaan L-treoniini-alkyyliesterin liuosta vedessä. Tässä tapauksessa on edullista, että saadun seoksen lämpötila ja pH-arvo säädetään 10-15°C:seen, vastaavasti 5,8-6,2. Lisäksi on edullista liuottaa trypsiini tai sen kaltainen entsyymi erikseen 10-20 paino-%:iin L-treoniini-alkyyliesterin liuosta vedessä.

On huomattava että kondensaatioreaktio suoritetaan ilman puskurin lisäämistä, reaktiokomponenttien puskurikapasiteetin ollessa riittävä - keksinnön määrittelemissä olosuhteissa - pH:n pitämiseksi alueella 5,5-7,5.

Edellä mainitut tunnusmerkit ovat menetelmälle oleellisia ja niiden ansiosta voidaan reaktio suorittaa hyvin lyhyessä ajassa (lyhennetty tekijällä 100) teollisessa mittakaavassa.

Kondensaatioreaktiossa reaktioaika riippuu muista reaktio-olosuhteista. Käytetään noin 5 minuutin - noin 30 minuutin reaktioaikoja, mieluummin noin 5 - noin 15 minuutin reaktioaikoja.

Johtuen kondensaatioreaktion lyhyistä reaktioajoista ei

olennaisesti esiinny sivureaktioita, eikä myöskään ole tarpeen käyttää tosyyli-L-fenyylialaniini-kloorimetyyli-ketonilla (TPCK) käsiteltyjä entsyymejä.

Keksinnön erään erityisen edullisen suoritustavan mukaan käytetään lähtöaineena raakaa sian insuliinia, esim. insuliinisulakakkaa. On huomattava että käytettäessä raakaa sian insuliinia keksinnön mukaisessa menetelmässä on mahdollista saada ihmisen insuliinia suurena saantona vastaten saantoa joka olisi saatavissa valmistettaessa kromatograafisesti puhdistettua sian insuliinia, kun molemmissa tapauksissa kokonaissaannot lasketaan käytetystä haimamäärästä.

On yllättävää ettei raa'an sian insuliinin käyttö lähtöaineena aiheuta vaikeuksia saadun ihmisen insuliiniesterin kromatograafisessa erottamisessa käytetystä entsyymistä ja reagoimattomasta desalaniini-B30-insuliinista.

Keksinnön mukaisen menetelmän kondensaatiossa käytetyn entsyymin täytyy pystyä lohkaisemaan lyysiini-karbonyyli-peptidisidoksia, ja näin ollen voidaan käyttää trypsiiniä tai sen kanssa sukua olevia entsyymejä, esim. akromobakterproteasaa I, jonka valmistus ja ominaisuudet on kuvattu julkaisussa Masaki et al., *Agric. Biol. Chem.*, 42, 1443-1445 (1978). Ei ole tarpeen käyttää entsyymejä, jotka on käsitelty tosyyli-L-fenyyli-alaniini-kloorimetyyliketonilla (TPCK) kymotrypsiinityyppeiden entsyymien aiheuttaman mahdollisen kontaminaation eliminoimiseksi edellä mainittujen lyhyiden reaktioaikojen ansiosta ja tällaisten entsyymien huonosta reaktiiviteetista käytetyssä reaktioseoksessa.

Entsyymiä voidaan käyttää liuotetussa muodossa, mutta se voi myös olla sidottu liukenemattomaan matriisiin, esim. agarosiin tai polyakryyliamidiin tai vastaaviin polymeerisiin aineisiin.

Kondensaatioreaktio suoritetaan olosuhteissa joissa entsymaattisesti katalysoitu hydrolyysi on riittävästi vaimennettu jotta peptidinmuodostusreaktio voisi edistyä. Kuten edellä mainittiin, on pH:n oltava välillä 5,5-7,5. Lämpötila on yleensä välillä 0-50°C, mieluummin välillä 10-37°C.

Kondensaatioreaktiossa tulisi reaktanttien, ts. des-B30-insuliinin ja L-treoniini-alkyyliesterin konsentraatio olla korkea, ja lisäksi tulisi L-treoniini-alkyyliesteriä käyttää suuressa ylimäärässä, aina molaariseen suhteeseen 200:1 asti, mieluummin suhteessa 20:1-100:1.

Kondensaatioreaktio suoritetaan veden kanssa sekoittuvien alempialkanolien tai niiden seosten läsnäollessa, jolloin hydrolyysireaktio on estynyt, ja reaktiokomponenttien liukenevuus parempi. Alempialkanolien konsentraatio tulisi valita alueelta 20-90%, mieluummin 30-80%, laskettuna reaktioseoksen kokonaistilavuudesta.

Kun kondensaatioreaktio on tapahtunut täydellisesti insuliinintapaiset proteiinit erotetaan muista komponenteista geelisuodatuksella, jolloin ihmisen insuliiniesteri erotetaan reagoimattomasta lähtöaineesta anioninvaihtokromatografialla. Reagoimatonta lähtöainetta voidaan mahdollisesti käyttää uudestaan menetelmässä.

Anioninvaihdosta kerätyistä, ihmisen insuliiniesteriä sisältävistä fraktioista poistetaan suolat, minkä jälkeen kerättyjen eluaattien pH-arvo säädetään noin 9,5 NaOH:lla. 24-48 tunnin kuluttua ympäristön lämpötilassa eristetään puhdasta ihmisen insuliinia kiteyttämällä tai jollakin muulla tavanomaisella tavalla.

Insuliinialkyyliesterin hydrolyysi edistyy tasaisesti pH-arvoissa alkaen noin 8,5 aina arvoon noin 10,5 vesipitoisessa liuoksessa. Tällä on se vaikutus että hydrolyysin jälkeen hydrolyysiseosta voidaan käsitellä edelleen helposti tavanomaiseen tapaan ja eristetty ihmisen insuliini saadaan erittäin puhtaana.

Niinpä keksinnön mukaisella menetelmällä valmistettu ihmisen insuliini on erittäin sopiva terapeuttisten insuliini-valmisteiden valmistamiseksi, koska se ei sisällä mitään proteolyyttisiä epäpuhtauksia, minkä ansiosta sitä voidaan käyttää pidennetyn vaikutuksen omaavien valmisteiden valmistamiseksi, koska se käyttäytyy samalla tavalla kuin ihmisen ja sian haimasta valmistettu ihmisen ja sian insuliini edel-

lä mainitussa "Ames"-kokeessa ja koska se ei sisällä sellaisia epäpuhtauksia, jotka ovat vaikeita poistaa yleisesti käytetyillä kromatograafisilla menetelmillä.

Erään edullisen suoritusmuodon mukaan, jossa raakaa insuliinia käytetään lähtöaineena, saadaan ihmisen insuliinia saantona, joka on oleellisesti sama kuin sellaisen, erittäin pitkälle puhdistetun sian insuliinin saanto, joka voidaan saada samasta määrästä raakaa insuliinia. Näin ollen on kyse menetelmästä, joka on sekä teollisesti että kliinisesti tyydyttävä aikaisemmin tuntemattomalla tavalla.

Keksinnön mukaista menetelmää havainnollistetaan seuraavilla esimerkeillä.

Esimerkki 1

Sian insuliinia raa'an insuliinin (suolakakun) muodossa vastaten 2000 mg sian insuliinia liuotettiin 200 ml:aan 0,2 M vesipitoista NH_4HCO_3 -liuosta (pH-arvo 8,4). Tähän liuokseen lisättiin 20 mg karboksipeptidaasia A vesipitoisen liuoksen muodossa konsentraationa noin 5 mg/ml. Seosta hämmennettiin huolellisesti 5 minuuttia, minkä jälkeen sen annettiin seistä 20°C:ssa 2,5 tuntia. Reaktioseos jäädytyskuivattiin.

Vapautuneen alaniinin määrittäminen aminohappomäärityksellä antoi lohkaisusaannoksi 92%.

Jäädytyskuivattu jauhe suspendoitiin 23,4 ml:aan 96%:ista etanolia, minkä jälkeen lisättiin liuos, jossa oli 4,00 g L-treoniini-metyyliesteriä ja 200 mg trypsiiniä 14,00 ml:ssa tislattua vettä, joka oli säädetty pH-arvoon 6,50 5 N kloorivetyhapolla. Huolellisen sekoittumisen jälkeen seoksen annettiin olla 35°C:ssa 15 minuuttia. Välittömästi sen jälkeen reaktio pysäytettiin säätämällä ensin pH arvoon 2,5 0,1 N kloorivetyhapolla ja tilavuus 100 ml:aan tislattulla vedellä.

Reaktioseoksen korkeapainenestekromatografia-analyysi osoitti ihmisen insuliiniesterin tuotoksi 80%.

Reaktioseos geelisuodatettiin Sephadex® G-50 Superfine (8 x 80 cm) pylväessä 1M etikkahapossa. Ihmisen insuliiniesteriä ja reagoimatonta des-alaniini-B30-insuliinia sisältävä fraktio jäädytyskuivattiin.

Saanto: 1612 mg tuoteseosta.

Sen jälkeen tuoteseokselle suoritettiin ioninvaihto 4°C:ssa DEAE-selluloosapylväässä (Whatmann DE-52) (9 x 23 cm) tasapainoitettu 140 ml:lla/tunti puskuria, joka sisälsi 0,02 M tris ja 7 M ureaa, säädetty pH-arvoon 8,1 kloorivetyhapolla. Kun tuotteen panostuminen oli tapahtunut täydellisesti pylväs eluoitiin 2,5 tuntia käyttäen edellä mainittua puskuriliuosta, sen jälkeen 2 tuntia käyttäen edellä mainittua puskuriliuosta sekoitettuna 0,0045 moolin kanssa natriumkloridia litraa kohti ja lopuksi 12 tuntia käyttäen edellä mainittua puskuria sekoitettuna 0,011 moolin kanssa natriumkloridia litraa kohti.

Eluaatti sisälsi kaksi proteiinipitoista pääfraktiota. Ensin eluoitu fraktio identifioitiin korkeapainenestekromatografialla ihmisen insuliiniesteriksi ja sen jälkeen eloitu fraktio desalanyyli-insuliiniksi.

Kerätystä ihmisen insuliiniesterifraktiosta poistettiin suola Sephadex® G-25 pylväässä 0,1 M natriumasetaatissa (pH-arvo 8,0) 4°C:ssa, minkä jälkeen pH säädettiin arvoon 9,5 1 N NaOH-liuoksella. Fraktion annettiin seistä 25°C:ssa 24 tuntia.

Saatiin 950 mg puhdasta ihmisen insuliinia, joka identifioitiin aminohappoanalyysillä ja korkeapainekromatografialla.

Esimerkki 2

Sian insuliinia raa'an insuliinin muodossa (suolakakku) vastaten 66,3 g sian insuliinia liuotettiin 6000 ml:aan 0,2 M ammoniumasetaattia, pH-arvo 8,4. Liuokseen lisättiin 600 mg karboksipeptidaasia A vesipitoisen liuoksen muodossa jonka konsentraatio oli noin 5 mg/ml. Seosta hämmennettiin huolellisesti 3 tuntia 20°C:ssa.

Desalaniini-insuliini saostettiin lisäämällä 15% (paino/til.) NaCl.

Eristetty ilmakeivattu sakka kaadettiin huolellisesti 770 ml:aan 96%:ista etanolia muodostaen näin desalaniini-insuliinin suspension etanolissa (liuos 1).

120 g Thr-O-Me, HCl liuotettiin 275 ml:aan tislattua vettä ja pH säädettiin arvoon 5,8 5M NaOH:lla (liuos 2).

60 ml:aan liuosta 2 lisättiin 600 mg trypsiiniä (sian) ja se saatettiin liukenemaan samalla varovaisesti hämmentäen (liuos 3).

Liuokset 1 ja 2 sekoitettiin kaatamalla liuos 1 hitaasti liuokseen 2 samalla hämmentäen. pH säädettiin arvoon 5,8 5M NaOH:lla. Sekoittamisen jälkeen seos jäähdytettiin 10°C:seen termostaattisesti säädetyssä astiassa.

Reaktio tapahtui liuoksen 3 lisäämisen jälkeen edellä mainittuun desalaniini-insuliinin ja Thr-O-Me:n seokseen 10 minuutin ajan.

Välittömästi sen jälkeen reaktio pysäytettiin säätämällä pH arvoon 2,5 0,1 N HCl:llä ja tilavuus 2400 ml:aan tislattulla vedellä.

Reaktioseoksen korkeapainenestekromatografia-analyysi osoitti ihmisen insuliiniesterin tuotoksi 87%.

Reaktioseosta käsiteltiin edelleen kuten esimerkissä 1 on selitetty, jolloin saatiin erittäin puhdas tuote (25,4 g) puolisynteettistä ihmisen insuliinia joka on sopiva terapeutisten insuliinivalmisteiden valmistamiseksi.

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä ihmisen insuliinin valmistamiseksi, jonka menetelmän mukaan sian insuliinituotetta käsitellään karboksipeptidaasilla A tai vastaavalla entsyymillä desalaniini-B30-insuliinituotteen valmistamiseksi, joka sen jälkeen kondensoidaan L-treoniini-alkyyliesterin kanssa trypsiinin tai sen kaltaisen entsyymin ja orgaanisen koluottimen läsnäollessa, minkä jälkeen näin muodostunut insuliini-esteri hydrolysoidaan ihmisen insuliinin muodostamiseksi, t u n n e t t u siitä, että desalaniini-B30-insuliinituote suspendoidaan alempialkanoliin, L-treoniini-alkyyliesterin ja trypsiinin tai sen kaltaisen entsyymin liuos vedessä, jonka pH

on säädetty arvoon noin 5,5 - noin 7,5 ilman puskurin lisäämistä, sekoitetaan suspension kanssa ja annetaan muodostuneen seoksen olla enintään 30 minuuttia.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että trypsiini tai sen kaltainen entsyymi liuotetaan erikseen osaan L-treoniini-alkyyliesterin liuosta vedessä, lisätään desalaniini-B30-insuliinituotteen suspensio loppuosaan L-treoniini-alkyyliesterin liuosta vedessä, saadun seoksen lämpötila ja pH-arvo säädetään ja sen jälkeen lisätään trypsiinin tai sen kaltaisen entsyymin erikseen valmistettu liuos osassa L-treoniini-alkyyliesterin liuosta vedessä.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että trypsiini tai sen kaltainen entsyymi liuotetaan erikseen 10-20 paino-%:iin L-treoniini-alkyyliesterin liuosta vedessä.

4. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytetty sian insuliinituote on raakaa sian insuliinia.

5. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että saadun seoksen lämpötila ja pH-arvo säädetään 10-15°C:seen, vastaavasti arvoon 5,8-6,2.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kondensaatioreaktio suoritetaan noin 5 - noin 15 minuutin ajanjakson aikana.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että desalaniini-B30-insuliinituote eristetään ilman käytetyn karboksipeptidaasi A:n tai vastaavan entsyymin erottamista.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytetty L-treoniini-alkyyliesteri on L-treoniini-metyyliesteri.

9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että alempi alkanoli on etanoli.

Patentkrav:

1. Förfarande för framställning av mänskligt insulin, i vilket förfarande en svininsulinprodukt behandlas med karboxipeptidas A eller ett motsvarande enzym för att bilda en desalanin-B30-insulinprodukt, vilken därefter kondenseras med en L-treonin-alkylester i närvaro av trypsin eller ett därmed besläktat enzym och ett organiskt kolösningsmedel, varefter den sålunda bildade insulinestern hydrolyseras för att bilda mänskligt insulin, k ä n n e t e c k n a t därav, att desalanin-B30-insulinprodukten suspenderas i en lågalkanol, en lösning av L-treonin-alkylestern och trypsinet eller det därmed besläktade enzymet i vatten inställs till ett pH-värde av ca 5,5 - 7,5 utan tillförsel av buffert, blandas med suspensionen och den erhållna blandningen lämnas för en tid av upp till 30 minuter.
2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att trypsinet eller det därmed besläktade enzymet upplöses separat i en del av lösningen av L-treonin-alkylestern i vatten, des-alanin-B30-insulinproduktens suspension tillförs den resterande delen av lösningen av L-treonin-alkylestern i vatten, den erhållna blandningens temperatur och pH-värde inställs och därefter tillförs den separat framställda lösningen av trypsinet eller det därmed besläktade enzymet i en del av lösningen av L-treonin-alkylestern i vatten.
3. Förfarande enligt patentkravet 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att trypsinet eller därmed besläktade enzymet löses separat i 10-20 vikt-% av lösningen av L-treonin-alkylestern i vatten.
4. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att den använda svininsulinprodukten är rått svininsulin.
5. Förfarande enligt patentkravet 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att den erhållna blandningens temperatur och pH-värde inställs till 10-15°C respektive 5,8-6,2.

6. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k -
n a t därav, att kondensationsreaktionen utförs under en
period av ca 5 - ca 15 minuter.

7. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k -
n a t därav, att desalanin-B30-insulinprodukten isoleras
utan separering av använt karboxipeptidas A:t eller motsva-
rande enzym.

8. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k -
n a t därav, att den använda L-treonin-alkylestern är L-
treonin-metylester.

9. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k -
n a t därav, att den använda lågalkanolen är etanol.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia:-Offentliga finska patent-
ansökningar: 810385.

Muita julkaisuja:-Andra publikationer:

Peptides 1980, Proceedings of the 16th European Peptide Symposium

Helsingoer DK, Aug. 31 - Sept. 6 1980, København 1981,

Ed. K. Brunfeldt, Trypsin catalized peptide synthesis: Modification
of the B-chain C-terminal rezion of insulin, Gattner H-G et al.

p. 372-377.