



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 32 224 T2** 2005.04.14

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 747 390 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 32 224.2**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 303 973.0**

(96) Europäischer Anmeldetag: **31.05.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **11.12.1996**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **21.04.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.04.2005**

(51) Int Cl.⁷: **C07K 1/14**

C07K 1/16, C07K 1/34, C07K 14/62

(30) Unionspriorität:

484545 07.06.1995 US

(73) Patentinhaber:

Eli Lilly and Co., Indianapolis, Ind., US

(74) Vertreter:

Spott & Weinmiller, 80336 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**Baker, Jeffrey Clayton, Indianapolis, Indiana
46205, US; Hanquier, Jose M., Martinsville, Indiana
46151, US; Shrader, Warren E., Indianapolis,
Indiana 46227, US**

(54) Bezeichnung: **Reduzierung von Gelation von Fettsäureacylierten Proteinen unter Nutzung von Zitratpuffer**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

1. Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verringerung des Einsetzens oder Auftretens einer Gelierung während der Verarbeitung und Reinigung von Fettsäure-acylierten Proteinen, speziell Fettsäure-acylierten Proinsulinen, Fettsäure-acylierten Insulinen oder Fettsäure-acylierten Insulinanaloga. Genauer gesagt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Verarbeitung und Reinigung von solchen acylierten Proinsulinen, Insulinen und Insulinanaloga und vor allem N-Palmitoyl-Lys^{B29} Humaninsulin in Gegenwart eines Citratpuffermittels.

2. Beschreibung des Stands der Technik

[0002] Es war lange ein Ziel der Insulintherapie, das Muster von endogener Insulinsekretion von normalen Individuen nachzuahmen. Der tägliche physiologische Bedarf für Insulin fluktuiert und kann in zwei Phasen unterteilt werden: (a) Die absorptive Phase, die einen Insulinpuls erfordert, um die Mahlzeitbedingte Blutglucosebelastung abzubauen und (b) die postabsorptive Phase, die eine anhaltende Menge an Insulin erfordert, um den Glucoseausstoß aus der Leber zu regulieren, um eine optimale Blutglucosemenge während den nüchternen Perioden aufrechtzuerhalten. Demnach umfasst eine wirksame Therapie im allgemeinen die kombinierte Verwendung von zwei exogenen Insulinen: Ein schnell wirkendes Mahlzeinsulin, das durch Bolusinjektionen bereitgestellt wird, und ein langwirksames basales Insulin, das durch eine Injektion ein- oder zweimal am Tag verabreicht wird.

[0003] Kürzlich zeigte eine Klasse an acylierten Insulinen vielversprechende Ansätze zur Verwendung als langwirksame Insulinbasaltherapie. Diese acylierten Insuline werden durch selektive Acylierung der freien Aminogruppen von monomerem Insulin, einschließlich Proinsulin, normalem Insulin und bestimmten Insulinanaloga mit einem aktivierten Fettsäurederivat hergestellt. Brauchbare Fettsäurederivate umfassen reaktive Verbindungen vom Fettsäuretyp, die mindestens eine sechs (6) Kohlenstoffatome lange Kette aufweisen und insbesondere die Fettsäurederivate, die 8 bis 21 Kohlenstoffatome in ihrer Kette aufweisen. Monoacyliertes normales Humaninsulin, das mit einem Palmitinsäurederivat acyliert ist, ist ein besonders vielversprechender Kandidat. Insuline, die in diese Kategorie fallen, sind in JP 1-254 699 A beschrieben.

[0004] Ein Problem, das mit diesen Fettsäure-acylierten Insulinen auftritt ist, dass sie eine ausgeprägte Tendenz zu Gelierung unter Bedingungen zeigen, die

normalerweise nach ihrer Herstellung auftreten, insbesondere während der anschließenden Reinigung und Konzentrierung. Während die Gründe, die zu diesem Phänomen führen, nicht verstanden sind, wurde beobachtet, dass Lösungen dieser Fettsäure-acylierten Insuline und insbesondere wässrige Acetonitrillösungen aus N-Palmitoyl Lys^{B29} Humaninsulin, eine sichtbare Veränderung unter herkömmlich verwendeten Bedingungen bezüglich Temperatur, pH und Proteinkonzentration in Gegenwart von normalerweise verwendeten Puffern durchmachen, wie Glycin und Essigsäure. Beispielsweise weisen wässrige Lösungen an N-Palmitoyl Lys^{B29} Humaninsulin bei Konzentrationen von mehr als 4 mg/ml und mit einem Gehalt über 20–30% Acetonitril eine starke Tendenz auf, bei Raumtemperatur in Gegenwart von 20 mM Glycin als Puffermittel schnell zu gelieren. Die auftretende Gelierung stört signifikant die korrekte Verarbeitung und schließliche Reinigung und Konzentrierung des Proteins. Wenn dieser Zustand auftritt ist die Zusammensetzung tatsächlich schwer zu pumpen oder auf andere Art zu bearbeiten, wenn dies nicht sogar ganz unmöglich wird. Dies führt zu einem Verlust bei der Geräte- und Anlagenbelegung. Während ein ähnliches Gelierphänomen manchmal bei der Verarbeitung von normalem Insulin beobachtet wurde, wurde es im allgemeinen mittels entscheidender Prozesskontrollmaßnahmen vermieden. Unglücklicherweise scheinen Fettsäure-acylierte Insuline weniger zu verzeihen, so dass das Gelierphänomen ein signifikantes Problem bei der Verarbeitung dieser Fettsäure-acylierten Proteine im kommerziellen Maßstab darstellt.

[0005] Die vorliegende Erfindung basiert auf der überraschenden Erkenntnis, dass durch die Verarbeitung dieser Fettsäure-acylierten Insuline in Gegenwart eines Citratpuffermittels als primärer Puffer im Prozessstrom, insbesondere in dem Prozessstrom, der ein polares organisches Lösemittel, wie Acetonitril enthält, die Tendenz dieser Fettsäure-acylierten Insuline und speziell von N-Palmitoyl Lys^{B29} Humaninsulin zu gelieren, stark verringert wird.

[0006] Die vorliegende Erfindung liefert daher ein Verfahren zur Verarbeitung einer wässrigen Lösung von solchen Fettsäure-acylierten Insulinen bei höheren Proteinkonzentrationen und mit einer geringeren Temperaturkontrolle, als dies sonst in Abwesenheit des Citratpuffermittels angemessen wäre. Die vorliegende Erfindung liefert auch wässrige Lösungen von Fettsäure-acylierten Proteinen mit einer verringerten Tendenz zur Gelierung.

Beschreibung der Erfindung

[0007] Alle Aminosäureabkürzungen, die in dieser Beschreibung verwendet werden, sind die, welche vom United States Patent and Trademark Office akzeptiert sind, wie dies in 37 C. F. R. § 1.822 (B)(2) be-

schrieben ist.

[0008] Die Ausdrücke "Insulin" und "normales Insulin", wie sie hierin verwendet werden, meinen humanes Insulin, Schweineinsulin oder Rinderinsulin. Insulin besitzt drei freie Aminogruppen: B¹-Phenylalanin, A¹-Glycin und B²⁹-Lysin. Die freien Aminogruppen an den Positionen A¹ und B¹ sind α-Aminogruppen. Die freie Aminogruppe an der Position B²⁹ ist eine ε-Aminogruppe.

[0009] Der Ausdruck "Proinsulin", wie er hierin verwendet wird, ist ein korrekt quervernetztes Protein der Formel:

B-C-A

worin

A für die A Kette von Insulin oder ein funktionelles Derivat hiervon steht,

B für die B Kette von Insulin oder einem funktionellen Derivat hiervon mit einer ε-Aminogruppe steht, und C das Verbindungspeptid von Proinsulin ist. Vorzugsweise besteht Proinsulin aus der A Kette von Humaninsulin, der B Kette von Humaninsulin und C steht für das neutrale Verbindungspeptid. Wenn Proinsulin die natürliche Sequenz aufweist, besitzt Proinsulin 3 freie Aminogruppen: Phenylalanin (1) (α-Aminogruppe), Lysin (29) (ε-Aminogruppe) und Lysin (64) (ε-Aminogruppe).

[0010] Der Ausdruck "Insulinanalogon" steht, wie er hierin verwendet wird, für ein korrekt quervernetztes Protein der folgenden Formel, das eine Insulinaktivität aufweist:

A-B

worin

A für die A Kette von Insulin oder ein funktionelles Derivat der A Kette von Insulin steht und

B für die B Kette von Insulin oder ein funktionelles Derivat der B Kette von Insulin mit einer ε-Aminogruppe steht und zumindest eines von A oder B eine Aminosäuremodifikation im Vergleich zur natürlichen Sequenz aufweist.

[0011] Bevorzugte Insulinanaloga umfassen Insulin, worin:

der Aminosäurerest an der Position B²⁸ für Asp, Lys, Leu, Val oder Ala steht,

der Aminosäurerest an der Position B²⁹ für Lys oder Pro steht,

der Aminosäurerest an der Position B¹⁰ für His oder Asp steht,

der Aminosäurerest an der Position B¹ für Phe oder Asp steht oder alleine oder in Kombination mit einer Deletion des Rests an der Position B² deletiert ist, der Aminosäurerest an der Position B³⁰ für Thr oder Ala steht oder deletiert ist, und

der Aminosäurerest an der Position B⁹ für Ser oder Asp steht, mit der Maßgabe, dass entweder die Position B²⁸ oder B²⁹ für Lys steht.

[0012] In biologischen Standardausdrücken, die dem Fachmann bekannt sind, sind die bevorzugten Insulinanaloga Lys^{B28}Pro^{B29}-Humaninsulin (B²⁸ steht für Lys, B²⁹ steht für Pro), Asp^{B28}-Humaninsulin (B²⁸ steht für Asp), Asp^{B1}-Humaninsulin, Arg^{B31,B32}-Humaninsulin, Asp^{B10}-Humaninsulin, Arg^{A0}-Humaninsulin, Asp^{B1},Glu^{B13}-Humaninsulin, Ala^{B26}-Humaninsulin und Gly^{A21}-Humaninsulin.

[0013] Der Ausdruck "Acylierung" meint die Einführung einer oder mehrerer Acylgruppen, die an freie Aminogruppen des Proteins kovalent gebunden sind.

[0014] Der Ausdruck "Fettsäure" meint eine gesättigte oder ungesättigte C₆-C₂₁ Fettsäure. Der Ausdruck "aktivierter Fettsäureester" meint eine Fettsäure, die mittels der allgemeinen Techniken aktiviert wurde, die in Methods of Enzymology, 25, 494-499 (1972) und Lapidot et al., in J. of Lipid Res. 8: 142-145 (1967) beschrieben wurden, wobei die Beschreibung hiervon hiermit eingeführt ist. Die bevorzugten Fettsäuren sind gesättigt und umfassen Myristinsäure (C14), Pentadecylsäure (C15), Palmitinsäure (C16), Heptadecylsäure (C17) und Stearinsäure (C18). Am bevorzugtesten ist die Fettsäure Palmitinsäure. Aktivierte Fettsäureester umfassen Derivate von Mitteln, wie Hydroxybenzotriazid (HOBt), N-Hydroxysuccinimid und Derivate hiervon. Der bevorzugte aktivierte Ester ist N-Succinimidylpalmitat.

[0015] Der Ausdruck "Vernetzung" bezieht sich auf die Bildung von Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten. Ein korrekt vernetztes Proinsulin, Insulin oder Insulinanalogon enthält 3 Disulfidbrücken. Die erste Disulfidbrücke wird zwischen den Cysteinresten an den Positionen 6 und 11 der A-Kette gebildet. Eine zweite Disulfidbrücke verbindet den Cysteinrest an der Position 7 der A-Kette mit dem Cystein an der Position 7 der B-Kette. Die dritte Disulfidbrücke verbindet das Cystein an der Position 20 der A-Kette mit dem Cystein an der Position 19 der B-Kette.

[0016] Der Ausdruck "wässrig" umfasst Colösemitelsysteme, wie auch die Verwendung von ausschließlich Wasser als Lösemittel.

[0017] Die vorliegende Erfindung betrifft ein verbessertes Verfahren zur Prozessierung eines Fettsäure-acylierten Proteins, insbesondere eines Fettsäure-acylierten Proinsulins, eines Fettsäure-acylierten Insulins oder eines Fettsäure-acylierten Insulinanalogs, wobei das Einsetzen einer Gelierung verringert wird. Die Erfindung betrifft insbesondere die Verarbeitung eines Fettsäure-acylierten Proteins durch Proteinmodifikation, Proteinanreicherung oder Proteinkonzentration und Proteinreinigung, wobei das Ein-

setzen einer Gelierung verringert wird. Die Erfindung ist dadurch charakterisiert, dass sie diese Verarbeitung und speziell solche Modifikations-, Anreicherungs- und Reinigungsoperationen aufweist, die mittels einer wässrigen Lösung des acylierten Proteins, die ein Citratpuffermittel enthält, ausgeführt werden und/oder wo dies geeignet ist solche Operationen in Gegenwart einer wässrigen Lösung ausgeführt werden, die ein Citratpuffermittel enthält. Bevorzugte acylierte Proteine, die mittels des vorliegenden Verfahrens verarbeitet werden, umfassen N-acyliertes Lys^{B29} Humaninsulin, vorzugsweise N-Palmitoyl Lys^{B29} Humaninsulin und B28-N^ε-acyliertes Lys^{B28}Pro^{B29} Humaninsulin B28 ist acyliertes Lys und B29 ist Pro), vorzugsweise B28-N^ε-Palmitoyl-Lys^{B28}Pro^{B29} Humaninsulin.

[0018] Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine gegen Gelierung resistente Fettsäure-acylierte Insulinlösung, die ein Fettsäure-acyliertes Insulin und eine Menge eines Citratpuffermittels enthält, die zur Verzögerung der Gelierung des Fettsäure-acylierten Proteins ausreicht.

[0019] Proinsulin, Insulin und Insulinanaloga, die zur Herstellung der Fettsäure-acylierten Proteine verwendet werden, welche der Hauptfokus der vorliegenden Erfindung sind, können durch eine Vielzahl an bekannten Peptidsynthesetechniken hergestellt werden, einschließlich klassischer Verfahren (in Lösung), Festphasenverfahren, semisynthetischer Verfahren und neuerer rekombinanter DNA Verfahren. Beispielsweise beschreiben Chance et al. US Anmeldung 07/388 201, EP 0 383 472 A, Brange et al., EP 0 214 826 A und Belagaje et al US 5 304 473 A die Herstellung verschiedener Proinsulin- und Insulinanaloga und sind hiermit eingeführt. Die A und B Ketten der erfindungsgemäßen Insulinanaloga können auch über ein Proinsulin-ähnliches Vorläufermolekül mittels rekombinanter DNA Techniken hergestellt werden. Siehe Frank et al., Peptides: Synthesis-Structure-Funktion, Proc. Seventh Am. Pept. Symp., Herausgeber D. Rich und E. Gross (1981), das hiermit eingeführt ist.

[0020] Im allgemeinen werden das Proinsulin, das Insulin und die Insulinanaloga durch die Umsetzung mit einem aktivierten Fettsäurederivat acyliert, wie einem aktivierten Fettsäureester. Die Acylierung von normalem Insulin mit Fettsäure wird in JP 1-254 699 beschrieben. Siehe auch Hashimoto et al., Pharmaceutical Research, 6: 171-176 (1989). Diese Beschreibungen sind hiermit eingeführt.

[0021] Vorzugsweise wird die Acylierung unter basischen Bedingungen in einem polaren Lösemittel ausgeführt, das heißt bei einem pH von mehr als 9,0 und vorzugsweise etwa 10,5. Während die Umsetzung in einem vollkommen organischen polaren Lösemittel unter Verwendung einer Base mit einem wässrigen

pKa von größer oder gleich 10,75 ausgeführt werden kann, wird ein gemischtes organisches und wässriges Lösemittel als Reaktionsmedium bevorzugt. Bevorzugte Basen sind Tetramethylguanidin, Diisopropylethylamin oder Tetrabutylammoniumhydroxid. Ein besonders geeignetes Lösemittel ist Acetonitril und Wasser, das etwa 50% Acetonitril enthält. Andere polare Lösemittel umfassen Dimethylsulfoxid, Dimethylformamid und dergleichen. Colösemittelsysteme umfassen auch Aceton und Wasser, Isopropylalkohol und Wasser und Ethanol und Wasser. Die Zeit- und Temperaturbedingungen, die zur Ausführung der Reaktionen geeignet sind, sind nicht eng begrenzt. Eine Temperatur von 0 bis 40°C und eine Umsetzungszeit von 15 Minuten bis 24 Stunden sollten im allgemeinen geeignet sein. Eine besonders bevorzugte Art zur Herstellung von solchen Fettsäure-acylierten Insulinen ist in der anhängigen US 08/341231 vom 17. November 1994 beschrieben, deren Beschreibung hiermit eingeführt ist.

[0022] Wenn die Umsetzung vollständig ist, wird das Reaktionsgemisch typischerweise mit Wasser verdünnt und es kann gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung Citronensäure zugegeben werden, um die Alkalinität zu neutralisieren. Das entstehende Citrat wirkt als Puffermittel für die anschließende Verarbeitung, einschließlich der Anreicherungs- und Reinigungsverfahren. In dieser Ausführungsform wird die Citronensäure als wässrige Lösung zum acylierten Protein gegeben und dient zur Absenkung des pH der Lösung unter den isoelektrischen Punkt (isoelektrischen pH) des acylierten Insulins. Normalerweise liegt das Protein zu diesem Zeitpunkt in einer geeignet gepufferten wässrigen Lösung zur weiteren Verarbeitung vor. Eine solche Verarbeitung umfasst insbesondere die Reinigung durch Standardchromatographieverfahren, wie Umkehrphasenchromatographie oder hydrophobe Chromatographie, die Konzentrierung durch Querstromfiltration, einen Lösemittelwechsel durch Ultrafiltration und dergleichen.

[0023] Für acyliertes Proinsulin, acyliertes Insulin und acylierte Insulinanaloga, insbesondere N-Palmitoyl-Lys^{B29} Humaninsulin, und B28-N-Palmitoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-Humaninsulin sollte der pH normalerweise unter etwa 3,0 und vorzugsweise zwischen etwa 1,5 und 2,5 mit wässriger Citronensäure eingestellt werden, wie dies erforderlich ist. Erforderlichenfalls kann der pH auch mit einer Base nachgestellt werden, wie Natriumhydroxid, um ihn im gewünschten Bereich zu halten. Ein pH von etwa 2,5 ist für die Verarbeitung von N-Palmitoyl Lys^{B29} Humaninsulin geeignet.

[0024] Bei der Anwendung der vorliegenden Erfindung ist es bekannt, dass das acylierte Protein einer Vielzahl an chemischen Behandlungen, physikalischen Trennungen und Reinigungen unterzogen

werden kann, einschließlich chromatographischer Behandlung und Querstromfiltration, wie zur Reinigung der Proteinzusammensetzung, Konzentrierung der Proteinlösung oder für den Lösemittelaustausch und chemische und enzymatische Behandlungen. Alle diese Arbeitsgänge werden vorzugsweise in Gegenwart des Citratpuffermittels der vorliegenden Erfindung ausgeführt, um das Einsetzen der Gelierung zu verringern. Die von der Erfindung umfasste Proteinprozessierung umfasst insbesondere die Reinigung durch Standardchromatographieverfahren, wie Umkehrphasenchromatographie, hydrophobe Chromatographie und dergleichen und die Proteinkonzentration durch Ultrafiltration und ähnliche Verfahren. Die Proteinprozessierung soll auch die Aufbewahrung der Proteinlösung in Lagertanks und ähnliche Vorbereitungen für solche Reinigungs- und Konzentrierungsschritte umfassen.

[0025] Gemäß der vorliegenden Erfindung kann das Citratpuffermittel auch in die wässrige Lösung des acylierten Insulins durch die Neutralisierung einer verdünnten Alkalilösung, wie der Lösung des Fettsäure-acylierten Proteins, die aus der Acylierungsreaktion gewonnen wird, mit einer anderen Säure, wie Chlorwasserstoffsäure oder Essigsäure, gefolgt von der Zugabe eines Citratsalzes gegeben werden. Geeignete Citratsalze umfassen beispielsweise Monosodiumcitrat, Dinatriumcitrat, Monoammoniumcitrat und Diammoniumcitrat. Wie hierin verwendet umfasst der Ausdruck "Citratpuffermittel" jede Verbindung, die Citrationen in die wässrige Proteinlösung einführt.

[0026] Um der Lösung des acylierten Insulins einen Gel-verzögernden Charakter zu geben sollte die Lösung mit einer Citrationenkonzentration von mindestens etwa 25 mM und vorzugsweise etwa 50 mM versehen werden. Während höhere Konzentrationen verwendet werden können, wird eine praktische Obergrenze von 1,0 M empfohlen, um die Verkomplizierung von eventuellen Aufarbeitungsoptionen und eventuellen Proteinreinigungsschritten zu vermeiden. Ähnlich sollte der pH der Lösung am besten innerhalb eines Bereichs von etwa 1,5 und 3,0 während der Verarbeitung gehalten werden. Im allgemeinen sollte ein pH von etwa 2,5 geeignet sein.

[0027] Danach wird die gesamte Verarbeitung der Lösung des Fettsäure-acylierten Proteins, speziell der Lösungen des Fettsäure-acylierten Insulins, die ein organisches polares Lösemittel, wie Acetonitril enthalten, und einschließlich verschiedener Proteinreinigungs- und Proteinkonzentrierungsschritte in Gegenwart des Citratpuffers ausgeführt werden, um die Wahrscheinlichkeit der Gelierung zu vermeiden. Solche Verarbeitungsschritte zielen gewöhnlich auf die schließliche Isolierung des acylierten Proteins, wie eines Fettsäure-acylierten Insulins, gewöhnlich als trockenes Pulver.

[0028] Beispielsweise kann das Fettsäure-acylierte Insulinreaktionsprodukt vor der Gewinnung eines pulverisierten Produkts durch nachfolgende Schritte der Chromatographie und Ultrafiltration gereinigt und angereichert werden. Um das Auftreten der Gelierung während der Verarbeitung zu verringern, werden diese Reinigungsschritte in wässriger Lösung in Gegenwart eines Citratpuffermittels ausgeführt.

[0029] Beispielsweise kann im Fall einer chromatographischen Trennung die aus der Acylierungsreaktion gewonnene Proteinlösung, die möglicherweise in einem organischen Lösemittel vorliegt, auf eine Chromatographiesäule aufgetragen werden und dann mittels einer wässrigen mobilen Phase oder einem wässrigen Elutionsmittel mit mindestens 25 mM Citratpuffermittel und vorzugsweise etwa 50 mM Citratpuffermittel eluiert werden. Der Fachmann erkennt, dass der Eluent ein organisches polares Lösemittel enthält, wie Acetonitril, dessen Konzentration sich während der Elution der Säule ändert (Gradientenelution), um die Elution des Proteins von der Säule zu erleichtern. Obwohl es nicht essentiell ist, ist es auch bevorzugt, dass die zu trennende Proteinlösung auf die Säule in einer Lösung aufgetragen wird, die einen Citratpuffer enthält.

[0030] Im Fall einer Ultrafiltration sollte jede Ultrafiltrationswaschlösung zusätzlich zur Bereitstellung der Insulinlösung für die Ultrafiltrationsmembran in einer Citratpufferlösung auch zumindest 25 mM des Citratpuffermittels und vorzugsweise 50 mM Citrat enthalten.

[0031] Nach diesen Reinigungs- und Anreicherungsschritten kann die wässrige Lösung des gereinigten Fettsäure-acylierten Proteins, insbesondere eines Fettsäure-acylierten Proinsulins, eines Fettsäure-acylierten Insulins oder eines Fettsäure-acylierten Insulinanalogons prozessiert werden, um das lösliche Protein als Pulver zu gewinnen. Bei der Anwendung der vorliegenden Erfindung kann jedes Verfahren zur Gewinnung des acylierten Proteins als Pulver, einschließlich Lyophilisierungs-(Gefriertrocknungs-), Kristallisations- oder Fällungstechniken verwendet werden. Die vorliegende Erfindung ist nicht auf die Art der Isolierung und Reinigung des acylierten Proteins in Pulverform beschränkt.

[0032] Die acylierten Insulin- und acylierten Insulinanalogonpulver, die schließlich mittels des Verfahrens der vorliegenden Erfindung hergestellt werden können, sind zur Herstellung von pharmazeutischen Zusammensetzungen brauchbar, die in der Insulintherapie verwendet werden, das heißt zur Verabreichung an einen behandlungsbedürftigen Patienten (das heißt einen Patienten, der an Hyperglycämie leidet). Solche pharmazeutischen Zusammensetzungen können eine wirksame Menge des Fettsäure-acylierten Insulins oder Fettsäure-acylierten Insu-

linanalogons in einer wässrigen Lösung mit einem Citratpuffermittel als eine Komponente in Kombination mit einem oder mehreren pharmazeutisch annehmbaren Hilfsstoffen oder Trägern enthalten. Für diese Zwecke können die pharmazeutischen Zusammensetzungen typischerweise so formuliert werden, dass sie etwa 100 Einheiten pro ml oder ähnliche Konzentrationen aufweisen, die eine wirksame Menge des Fettsäure-acylierten Insulins oder Fettsäure-acylierten Insulinanalogons enthalten. Diese Zusammensetzungen sind typischerweise wenn auch nicht notwendigerweise von der Art her parenteral und können durch jede einer Vielzahl an Techniken mittels herkömmlicher Hilfsstoffe oder Träger für parenterale Produkte hergestellt werden, die in der Technik gut bekannt sind. Siehe beispielsweise Remington's Pharmaceutical Sciences, 17. Ausgabe, Mack Publishing Company, Easton, PA, USA (1985), das hiermit eingeführt ist. Beispielsweise können Dosisformen zur parenteralen Verabreichung durch Suspendieren oder Lösen der gewünschten Menge des Insulinpulvers in einem nicht toxischen flüssigen Träger, der zur Injektion geeignet ist, wie ein wässriges Medium, und der Sterilisierung der Suspension oder Lösung hergestellt werden. Alternativ dazu kann eine abgemessene Menge des Insulinpulvers in ein Gläschen gegeben werden und das Gläschen und deren Inhalt werden sterilisiert und verschlossen. Es kann eine begleitende Ampulle oder ein Träger zum Mischen vor der Verabreichung bereitgestellt werden.

[0033] Pharmazeutische Zusammensetzungen, die für eine parenterale Verabreichung vorgesehen sind, verwenden Verdünnungsmittel, Hilfsstoffe und Träger, wie Wasser und wassermischbare organische Lösemittel, wie Glycerin, Sesamöl, Erdnussöl, wässriges Propylenglycol, N,N-Dimethylformamid und dergleichen. Beispiele für solche pharmazeutischen Zusammensetzungen beinhalten sterile, isotonische, wässrige Kochsalzlösungen des Insulins, die mit einem pharmazeutisch annehmbaren Puffer gepuffert sein können und die pyrogenfrei sind. Zusätzlich kann die parenterale pharmazeutische Formulierung Konservierungsstoffe enthalten, wie meta-Cresol oder andere Mittel zur Einstellung des pH des Endprodukts, wie Natriumhydroxid oder Chlorwasserstoffsäure, und Stabilisationsmittel, wie Zinksalze.

[0034] Die folgenden Beispiele werden bereitgestellt, um die Erfindung zu erläutern und zu erklären. Während die Erfindung unter Bezugnahme auf die Verarbeitung von Lösungen erläutert wird, die N-Palmitoyl Lys^{B29} Humaninsulin enthalten, sollte der Umfang der Erfindung nicht so betrachtet werden, dass er durch diese Beispiele beschränkt wird. Falls nichts anderes angegeben ist, beziehen sich alle Anteile und Prozentsätze auf das Gewicht und alle Temperaturen sind in Grad Celsius angegeben.

Beispiel 1

[0035] Eine wässrige Lösung eines Fettsäure-acylierten biosynthetischen Humaninsulins (N-Palmitoyl-Lys^{B29} Humaninsulin), die etwa 12,5 Volumenprozent Acetonitril und 12,5 mM Borsäure enthält, pH 2,5 und eine Temperatur von 4°C aufweist, wird auf eine Umkehrphasensäule mit geringer Leistung aufgetragen. Die Säule ist mit SP20SS Harz gepackt, das von Mitsubishi verfügbar ist, das mit einer wässrigen Lösung äquilibriert wurde, die 10 Volumenprozent Acetonitril und 50 mM Citronensäure bei einem pH von 2,5 und ebenfalls einer Temperatur von 4°C enthält. Das acylierte Insulin wird auf das Harz mit einem Verhältnis von 7 Gramm Insulin pro Liter gepacktem Harz aufgetragen. Nach dem Beladen der Säule wird die Säule mit einem (1) Säulenvolumen einer wässrigen Pufferlösung gewaschen, die 25 Volumenprozent Acetonitril und 50 mM Citronensäure enthält und einen pH von 2,5 aufweist. Die beladene Säule wird mit einem linearen Gradienten aus 25 bis 55 Volumenprozent Acetonitril in einer wässrigen 50 mM Citronensäurelösung mit einem pH von 2,5 und einer Temperatur von 4°C eluiert. Die Säule wird mit fünf (5) Säulenvolumina an Eluat eluiert. Die Fraktionen werden gesammelt und entsprechend vereinigt.

[0036] Ein Teil der entstehenden Hauptmenge wird für 2 Wochen auf 4°C gehalten und ein weiterer Teil wird für 12–16 Stunden auf 25°C ohne sichtbare Zeichen einer Gelierung in einer der Lösungen gehalten.

Vergleichsbeispiel 1

[0037] Eine ähnliche wässrige Lösung eines Fettsäure-acylierten biosynthetischen Humaninsulins (N-Palmitoyl-Lys^{B29} Humaninsulin), die etwa 12,5 Volumenprozent Acetonitril und 12,5 mM Borsäure enthält, pH 2,5 und eine Temperatur von 4°C aufweist, wird auf eine Umkehrphasensäule mit geringer Leistung aufgetragen. In diesem Fall ist die Säule auch mit SP20SS Harz gepackt, wird aber statt dessen mit einer wässrigen Lösung, die 10 Volumenprozent Acetonitril und 20 mM Glycin bei einem pH von 2,8–3,2 enthält, voräquilibriert. Unter Verwendung desselben Insulinbeladungsverhältnisses, Waschverfahrens und Elutionsprotokolls werden Fraktionen gesammelt und entsprechend vereinigt. In diesem Fall geliert ein Teil der entstehenden Hauptmenge, die bei 4°C gehalten wird, innerhalb von (3) Tagen, während die andere Fraktion der Hauptmenge, die bei 25°C gehalten wird, innerhalb einer Stunde geliert. Die Reinheiten der in den unterschiedlichen Puffern in Beispiel 1 und Vergleichsbeispiel 1 gesammelten Hauptmengen sind nicht signifikant unterschiedlich.

Beispiel 2

[0038] Eine wässrige Lösung eines Fettsäure-acy-

lierten biosynthetischen Humaninsulins (N-Palmitoyl-Lys^{B29} Humaninsulin), die etwa 32 Volumenprozent Acetonitril und 50 mM Citrat bei einem pH von 2,45 enthält, wird mit einer Querstromgeschwindigkeit von 1,5 bis 2,0 l/min unter einem Transmembrandruck von 10 bis 40 psi mit einer Temperatur im Bereich von 5–13°C durch eine Millipore® Membran mit einer Molekulargewichtsausschlussgrenze von 5000 (ein Quadratfuß) ultrafiltriert, um die Konzentration von etwa 4,0 mg/ml auf etwa 15 mg/ml zu erhöhen. Es bildet sich nicht nur kein Gel während der Ultrafiltration, sondern das Retentat, das 15 mg/ml des acylierten Insulins und etwa 32 Volumenprozent Acetonitril enthält, wird für 2 Wochen bei 5°C gelagert und zeigt keine Anzeichen einer Gelbildung.

Vergleichsbeispiel 2

[0039] Eine wässrige Lösung eines Fettsäure-acylierten biosynthetischen Humaninsulins (N-Palmitoyl-Lys^{B29} Humaninsulin), die 32% Acetonitril und 20 mM Glycin bei einem pH von 2,5 enthält, wird bei einer Temperatur im Bereich von 9–16°C und einer Proteinkonzentration von 4,5 mg/ml ultrafiltriert, wobei das Permeat in den Vorlagebehälter zurückgeführt wird, so dass die Lösung nicht konzentriert wird, wobei dieselben Bedingungen für Flussrate und Transmembrandruck wie in Beispiel 2 verwendet werden. Die Lösung wird für eine Stunde durch eine Millipore® Membran mit einer Molekulargewichtsausschlussgrenze von 5000 (ein Quadratfuß) filtriert. Die Lagerung des Retentats, das 4,5 mg/ml acyliertes Insulin enthält, für 2 Tage bei 5°C, führt zu einer Bildung von großen Gelklumpen. Eine Probe der ursprünglichen Lösung, die keiner Verarbeitung durch die Ultrafiltrationseinheit unterzogen wird, geliert unter denselben Lagerbedingungen nicht.

Beispiel 3

[0040] Eine wässrige Lösung eines Fettsäure-acylierten biosynthetischen Humaninsulins (N-Palmitoyl-Lys^{B29} Humaninsulin), worin etwa 35 bis 40 Volumenprozent Acetonitril und 50 mM Citrat bei einem pH von 2,45 enthalten sind, wird mit einer Querstromgeschwindigkeit von etwa 1,5 bis 2,0 l/min unter einem Transmembrandruck von 10 bis 40 psi und einer Temperatur im Bereich von 5–13°C durch eine Millipore® Membran mit einer Molekulargewichtsausschlussgrenze von 5000 (ein Quadratfuß) ultrafiltriert, um die Konzentration von etwa 7,5 mg/ml bis etwa 70 mg/ml zu erhöhen. Es bildet sich kein Gel während der Ultrafiltration.

Vergleichsbeispiel 3

[0041] Eine wässrige Lösung eines Fettsäure-acylierten biosynthetischen Humaninsulins (N-Palmitoyl-Lys^{B29} Humaninsulin), die etwa 35 bis 40 Volumenprozent Acetonitril und 20 mM Glycin bei einem pH

2,5 enthält, wird durch eine Amiconultrafiltrationsmembran mit einer Molekulargewichtsausschlussgrenze von 3000 bei ähnlichen Bedingungen für Querstrom und Transmembrandruck wie die in Beispiel 3 und einer Temperatur im Bereich von 5–10°C ultrafiltriert, um die Konzentration von 1,5 mg/ml zu erhöhen. Wenn die Konzentration des acylierten Insulins etwa 6 mg/ml erreicht, wird die Lösung trüb. Wenn die Konzentration 10 mg/ml erreicht haben sollte, geliert die Lösung. Durch die Verdünnung der anfänglichen acylierten Insulinlösung auf etwa 20 Volumenprozent Acetonitril ist es möglich, das Protein auf 10 mg/ml ohne Gelierung zu konzentrieren.

[0042] Die Prinzipien, bevorzugten Ausführungen und Durchführungsarten der vorliegenden Erfindung wurden in der vorangehenden Beschreibung beschrieben. Obwohl die vorliegende Erfindung im Detail im Zusammenhang der Reinigung und schließlich Gewinnung eines Fettsäure-acylierten Proinsulins, eines Fettsäure-acylierten Insulins und eines Fettsäure-acylierten Insulinanalogons und speziell zur Verarbeitung von N-Palmitoyl-Lys^{B29} Humaninsulin beschrieben ist, ist beabsichtigt, dass die Erfindung auch auf andere Fettsäure-acylierte Proteine anwendbar ist.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Reinigung eines Fettsäure-acylierten Proteins durch chromatographische Trennung, gekennzeichnet durch Elution des Fettsäure-acylierten Proteins mittels einer wässrigen Lösung, die eine Menge eines Citratpuffermittels enthält, die zur Verzögerung der Gelierung des Fettsäure-acylierten Proteins ausreicht.

2. Verfahren zur Konzentrierung einer Lösung eines Fettsäure-acylierten Proteins durch Querstrom-Filtration, gekennzeichnet durch Einbringung des Fettsäure-acylierten Proteins in eine Filtermembran als wässrige Lösung, die eine Menge eines Citratpuffermittels enthält, die zur Verzögerung der Gelierung des Fettsäure-acylierten Proteins ausreicht.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, worin das Fettsäure-acylierte Protein aus einem Fettsäure-acylierten Proinsulin, einem Fettsäure-acylierten Insulin und einem Fettsäure-acylierten Insulinanalogon ausgewählt ist.

4. Verfahren nach Anspruch 3, worin das Fettsäure-acylierte Protein ein Insulinanalogon ist, worin der Aminosäurerest an der Position B30 Thr oder Ala ist oder deletiert ist und die Fettsäure Myristinsäure ist.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, worin die wässrige Lösung eine Citratkonzentration von 25 mM aufweist.

6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die wässrige Lösung einen pH von 1,5 bis 3,0 aufweist.

7. Gelierungsresistente Lösung eines Fettsäure-acylierten Proteins, die ein Fettsäure-acyliertes Protein und eine Menge eines Citratpuffermittels aufweist, die zur Verzögerung der Gelierung des Fettsäure-acylierten Proteins ausreicht, worin das Fettsäure-acylierte Protein aus einem Fettsäure-acylierten Proinsulin, einem Fettsäure-acylierten Insulin und einem Fettsäure-acylierten Insulinanalogon ausgewählt ist.

8. Proteinlösung nach Anspruch 7, worin das Fettsäure-acylierte Protein ein Insulinanalogon ist, worin der Aminosäurerest an der Position B30 Thr oder Ala ist oder deletiert ist und die Fettsäure Myristinsäure ist.

9. Proteinlösung nach Anspruch 7 oder Anspruch 8, worin die wässrige Lösung eine Citratkonzentration von 25 mM aufweist.

10. Proteinlösung nach einem der Ansprüche 7 bis 9, worin die wässrige Lösung einen pH von 1,5 bis 3,0 aufweist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen