

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 148714 B



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: 1300/82

(51) Int.Cl.⁴: C 12 P 21/02

(22) Indleveringsdag: 23 mar 1982

(24) Løbedag: 23 jul 1981

(41) Alm. tilgængelig: 23 mar 1982

(44) Fremlagt: 09 sep 1985

(86) International ansøgning nr.: PCT/DK81/00074

(86) International indleveringsdag: 23 jul 1981

(85) Videreførelsesdag: 23 mar 1982

(30) Prioritet: 24 jul 1980 DK 3197/80

(71) Ansøger: DE *FORENEDE BRYGGERIER A/S; København, DK.

(72) Opfinder: Klaus *Breddam; DK, Jack Taaning *Johansen; DK, Fred *Widmer; US.

(74) Fuldmægtig: Patentbureauet Hofman-Bang & Boutard

(54) Fremgangsmåde til enzymatisk udskiftning af
B-30 aminosyren i insuliner

(57) Sammendrag:

i nærvær af et L-specifikt serin- eller thiolcarboxypeptidase-enzym i en vandig opløsning eller dispersion ved pH ca. 7 - 10,5 til dannelsen af et insulinderivat: Ins-B-OH, Ins-B-NR¹R², Ins-B-B-NR¹R², Ins-B-OR³, Ins-B-SR³ eller Ins-B-SeR³, hvorefter man om ønsket fraspalter en gruppe -NR¹R², -B-NR¹R², -OR³, -SR³ eller SeR³, fortrinsvis ved anvendelse af et carboxypeptidase-enzym. Fraspaltningen kan også gennemføres på derivater opnået ved andre metoder.

Ved anvendelse af svineinsulin som substratkomponent og threonin som den aminosyre, der indgår i aminosyrestrengen, opnås human insulin.

1300-82

B-30 aminosyren i insuliner udskiftes enzymatisk ved omsætning af et insulin Ins-X, hvori X betegner B-30 aminosyren, som substratkomponent med en aminosyrestreng valgt blandt

(a) aminosyrer med formlen: H-B-OH,

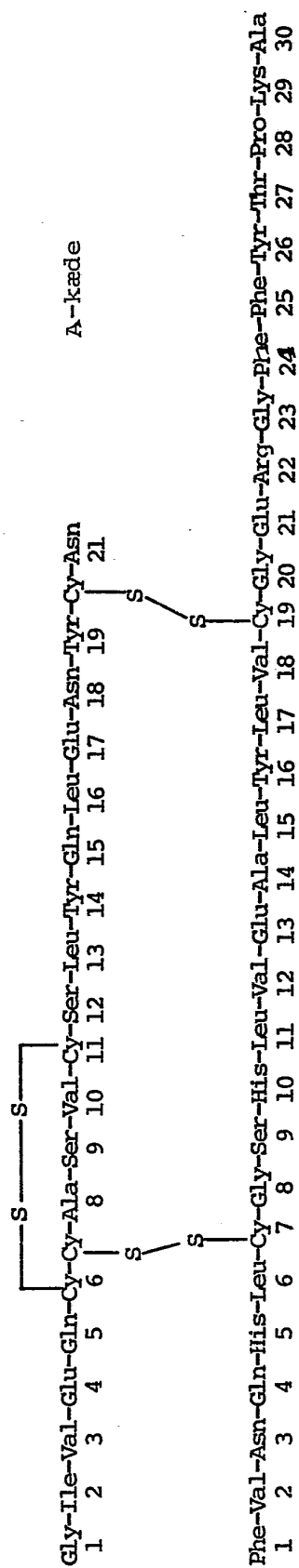
(b) eventuelt N-substituerede aminosyreamider med formlen: H-B-NR¹R², hvori B betegner en aminosyrestreng, og R¹ og R² uafhængigt af hinanden betegner hydrogen, amino, hydroxy, alkyl, cycloalkyl, aryl, heteroaryl eller aralkyl, idet R¹ og R² endvidere sammen med nitrogenatomet kan danne en heterocyklisk gruppe, der kan indeholde et yderligere heteroatom, og

(c) aminosyreestere med formlen: H-B-OR³, H-B-SR³ eller H-B-SeR³, hvori B betegner en aminosyrestreng, og R³ betegner alkyl, cycloalkyl, aryl, heteroaryl eller aralkyl,

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til enzymatisk udskiftning af den C-terminale aminosyre i B-kæden (B-30) i insuliner.

- 5 Det er velkendt, at insuliner fra forskellige hvirveldyrarter, herunder pattedyr og mennesker, udviser forskelle i deres primære struktur. Siden Sanger i 1958 bestemte primærstrukturen af okseinsulin

Okseinsulin



2

B-kæde

har man fastlagt primærstrukturen for insuliner fra andre hvirveldyrarter.

Disse resultater viste, at forskelle i aminosyrerne
 5 kan forekomme mange forskellige steder inden for hver kæde. Imidlertid er visse strukturelle træk fælles for alle de kendte insuliner, f.eks. stillingen af de 3 disulfidbindinger, den N-terminale del af A-kæden, B23-26 sekvensen i den C-terminale del af B-kæden, etc.

10

Forskellene i primærstrukturen af visse gangse insuliner fremgår af nedenstående tabel.

	A-kæde				B-kæde		
	4	8	9	10	3	29	30
15							
Okse	Glu	Ala	Ser	Val	Asp	Lys	Ala
Får	Glu	Ala	Gly	Val	Asn	Lys	Ala
Hest	Glu	Thr	Gly	Ileu	Asn	Lys	Ala
Sejhval	Glu	Ala	Ser	Thr	Asn	Lys	Ala
20							
Svin	Glu	Thr	Ser	Ileu	Asn	Lys	Ala
Spermacethval	Glu	Thr	Ser	Ileu	Asn	Lys	Ala
Hund	Glu	Thr	Ser	Ileu	Asn	Lys	Ala
Human	Glu	Thr	Ser	Ileu	Asn	Lys	Thr
Kanin	Glu	Thr	Ser	Ileu	Asn	Lys	Ser
25							
Rotte 1	Asp	Thr	Ser	Ileu	Lys	Lys	Ser
Rotte 2	Asp	Thr	Ser	Ileu	Lys	Met	Ser

Opfindelsen forklares nærmere nedenfor i forbindelse med den specifikke omdannelse af svineinsulin til human
 30 insulin, d.v.s. udskiftning af B-30 alanin med threonin, men det ses let, at den beskrevne metode lige så vel kan anvendes på andre typer insulin, således at f.eks. kanininsulin også kan omdannes til human insulin, okseinsulin kan omdannes til B-30 (Thr) okseinsulin, etc.

35

Tanken at omdanne svineinsulin til human insulin ad

semisyntetisk vej har været et attraktivt problem inden for insulinkemien.

Som nævnt ovenfor afviger human insulin kun fra svine-
5 insulin med en enkelt aminosyre, nemlig den C-terminale
rest af B-kæden (B-30), der er threonin i human insulin
og alanin i svineinsulin. Udskiftningen af alanin med
threonin blev først gennemført kemisk, og senere har man
anvendt enzymatiske metoder. Ruttenberg (1972) (Ref. 1)
10 har beskrevet den kemiske omdannelse af svineinsulin
til human insulin: esterificering til insulin-hexamethyl-
ester, hydrolyse med trypsin til desoctapeptidinsulin
(DOI)-pentamethylester, blokering af de aminoterminal-
grupper, kemisk kobling med et syntetisk octapeptid af
15 den tilsvarende humane insulinsekvens, sur deblokering
af aminogruupperne og endelig basisk forsæbning af
methylestergrupperne. Imidlertid har ingen været i stand
til at producere ren human insulin ved denne metode,
eftersom de kemiske procedurer, og især det sidste basi-
20 ske forsæbningstrin, i betydelig grad beskadiger insulin-
molekylet, ligesom der dannes isoasparagin i den C-ter-
minale del af A-kæden (Gattner et al. (Ref. 2)). For at
forebygge denne virkning har Obermeier og Geiger (1976)
(Ref. 3) gennemført fragmentkondensation uden beskyttelse
25 af sidekædecarboxylgrupperne i DOI. De kunne isolere
human insulin efter omfattende rensning, men kun i meget
lave udbytter. Lignende metoder er anvendt af Gattner
et al. (Ref. 2) under anvendelse af forskellige insulin-
fragmenter. Imidlertid har ingen endnu været i stand til
30 at fremstille human insulin i mere end spormængder ved
kemiske metoder.

M. Bodanszky et al. angiver i U.S.A. patentskrift nr.
3.276.961 en fremgangsmåde til fremstilling af human
35 insulin, hvorved human insulin angiveligt blev fremstil-
let ud fra andre animalske insuliner ved indvirkning af

- et enzym, såsom metallocarboxypeptidasen carboxypeptidase A og trypsin i nærvær af threonin. Denne proces har ikke sandsynlighed for at føre til human insulin, fordi trypsin og carboxypeptidase A under de angivne betingelser
- 5 hydrolyserer ikke blot B29-B30 lysyl-alanin peptidbindingen, men også peptidbindinger andre steder i insulinet. Trypsin hydrolyserer fortrinsvis peptidbindingen B22-B23 arginyl-glycin frem for bindingen B29-B30 lysyl-alanin. Ligeledes kan carboxypeptidase A ikke selektivt frigøre
- 10 alanin ved C-terminalen i B-kæden uden at frigive asparagin fra C-terminalen i A-kæden. Bestemte betingelser, nemlig omsætning i en ammoniumhydrogencarbonatpufferopløsning, er nødvendige for at forebygge frigivelse af asparaginet. Denne betingelse blev først opdaget i 1978 (Schmitt,
- 15 Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 359, 799-802 (1978)). Endvidere vil der i praksis næppe foregå en peptidsyntese, eftersom hydrolyseforholdet er hurtigere end synteseforholdet under nævnte betingelser. Dette bekræftes indirekte af Quijcho et al. Adv. Prot. Chem. 25, 1-53 (1971) Acad.
- 20 Press. N.Y. Eds. Anfinsen, Edsall & Richards, hvor det på side 27 angives, at carboxypeptidase A hverken danner acylenzym mellemprodukter eller udviser transpeptiderings- eller transesterificeringsaktivitet.
- 25 Inouye et al. (Ref. 4) har vist, at human insulin kan opnås ved at koble N-terminalbeskyttet DOI fra svineinsulin med et syntetisk octapeptid svarende til B-23 - B-30 sekvensen i human insulin ved anvendelse af trypsin som katalysator.
- 30 Denne metode er imidlertid besværlig, idet den først kræver en trypsinkatalyseret nedbrydning af svineinsulin til DOI, der derpå terminalbeskyttes ved acylering med BOC-N₃ og derpå inkuberes i 20 timer med et separat
- 35 syntetiseret humant B-23 - B-30 octapeptid, hvori B-29 lysin er BOC-beskyttet. Det således opnåede (BOC)₃-human

insulin deblokeres derpå med trifluoreddikesyre/anisol ved 0°C i 60 min. Udbyttet var 49% beregnet på det anvendte (BOI)₂-DOI

- 5 Tilsvarende har Morihara et al. (Ref. 5) syntetiseret human insulin ud fra des-alanin(B-30)-insulin (DAI) opnået ved nedbrydning af svineinsulin med carboxypeptidase A i 8 timer. 10 mM DAI inkuberedes med et stort overskud (0,5 M) threonin-OBu^t ester ved 37°C i 20 timer
- 10 i nærvær af trypsin og høje koncentrationer af organiske co-solventer. Det dannede [Thr - OBU^t - B-30] insulin deblokeredes med trifluoreddikesyre i nærvær af anisol. Udbyttet var 41%. I tilsvarende eksperimenter opnåedes [Thr - B30] okseinsulin i 60% udbytte.

- 15 Også denne metode er besværlig, eftersom den kræver en forbehandling af det som udgangsmateriale anvendte insulin, lange koblingstider og et separat deblokerings-trin. Der kræves endvidere store mængder af organiske
- 20 co-solventer for at minimere den hydrolytiske virkning af enzymet.

- I et lignende eksperiment har Morihara et al. (Ref. 6) anvendt Achromobacter Protease I som enzymatisk katalysator for kobling af DAI med stort overskud af Thr
- 25 - OBU^t under dannelse af [Thr - OBU^t - B-30] insulin, der isoleredes og deblokeredes som ovenfor. Selv om man kan opnå høje udbytter (52%) var reaktionstiden 20 timer.

- 30 Et lignende eksperiment med okseinsulin førte til [Thr - OBU^t - B-30] okseinsulin i 58% udbytte.

- Fremgangsmåderne beskrevet i Ref. 5 og 6 er også omtalt
- 35 i EP-ansøgning 17938 og DK-ansøgning 1556/80, jfr. fremlæggelsesskrift nr. 146.482.

Det er fornylig blevet påvist, at enzymet carboxypeptidase-Y er en effektiv katalysator for peptidsynteser (Widmer og Johansen (Ref. 7)). Det er endvidere blevet vist, at enzymet under visse betingelser katalyserer

5 udskiftningen af C-terminale aminosyrer i et peptid med en anden aminosyre eller aminosyrederivat i en trans-peptideringsreaktion (jfr. international ansøgning nr. WO 80/02151, videreført som DK-ansøgning 5202/80, samt EP-ansøgning 17485. De tilgrundliggende reaktionsbetin-

10 gelser er mere udførligt forklaret af Breddam et al. (Ref. 11), der også erkendte CPD-Y's ukendte peptidyl-aminosyreamid-hydrolaseaktivitet.

Selv om det generelle princip for enzymkatalyseret trans-peptideringsreaktion således er beskrevet og eksemplificeret i ovennævnte DK-ansøgning 5202/80, er anvendeligheden i forbindelse med insuliner hverken omtalt eller

15 vist.

Formålet med den foreliggende opfindelse er at angive en fremgangsmåde til enzymatisk udskiftning af B-30 aminosyren i insuliner, som ikke er behæftet med de ovennævnte ulemper, og nærmere bestemt en fremgangsmåde, som ikke kræver forbehandling af insulinudgangsmaterialet,

25 lange reaktionstider og kemiske deblokeringsstrin.

Mere specifikt er det formålet med opfindelsen at tilvejebringe en enestående og simpel fremgangsmåde til omdannelse af svineinsulin til human insulin af høj renhed

30 og i gode udbytter.

Dette opnås ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, der er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del

35 anførte.

Den foreliggende opfindelse hviler på den overraskende

erkendelse, at det ovennævnte enzym carboxypeptidase-Y kan omdanne svineinsulin til human insulin ved udskiftning af B-30 alanin med threonin i et enkelt trin uden isole- ring af et mellemprodukt og efterfølgende deblokerings-
5 behandling. Om ønsket kan man dog isolere et insulinamid- mellemprodukt, der om ønsket derefter kan deamideres under anvendelse af det samme enzym carboxypeptidase-Y.

Som yderligere belyst nedenfor er det mest velegnede
10 derivat for denne omdannelse threoninamid. Imidlertid vil omdannelsen ofte resultere i en blanding af human insulin og en vis mængde uomsat svineinsulin, som det er vanskeligt at adskille, hvorfor de dannede human insulin-amidmellemprodukter fortrinsvis separeres fra
15 reaktionsblandingen, der bl.a. indeholder uomsat svine- insulin, og derpå deamideres, med fordel ved hjælp af det samme enzym carboxypeptidase-Y, som ligeledes forkla- ret nedenfor.

20 På grund af af CPD-Y's bredspektrede peptidaseaktivitet, som udførligt beskrevet og vist i de ovennævnte patent- ansøgninger og artikler, kan der i stedet for svineinsulin som udgangsmateriale anvendes en hvilken som helst anden insulin, f.eks. fra de ovenfor nævnte arter, og en hvilken
25 som helst anden aminosyre kan anvendes til udskiftnings- reaktionen.

Også andre enzymer er anvendelige som nærmere forklaret
nedenfor.

30

Den meget enkle karakter af fremgangsmåden ifølge opfin- delsen er virkelig overraskende, selv på baggrund af DK-ansøgning 5202/80 og USA patentskrift nr. 3.276.961, eftersom det måtte forventes, at ikke blot B-30 aminosyren,
35 men også A-21 asparagin, der er fælles for alle de oven- nævnte insuliner, ville blive angrebet af enzymet.

I DK-ans. 5202/80 er de ønskede enzymatiske karakteristika med hensyn til en almen peptidsyntese beskrevet i detaljer, og det er anført, at en række carboxypeptidaser udviser forskellige enzymatiske aktiviteter, som er meget pH
5 afhængige, således at de f.eks. i basisk miljø ved pH 8 - 10,5 udviser overvejende esterase- eller amidase-aktivitet og ved pH 9 - 10,5 ingen eller kun ubetydelig carboxypeptidaseaktivitet, der imidlertid bliver mere og mere udtalt ved pH-værdier faldende under 9. Esteraseak-
10 tiviteten er af mindre betydning i den foreliggende sammenhæng, men bortset herfra kan disse egenskaber også med fordel udnyttes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, eftersom de bidrager til gennemførelsen af en l-trins proces med gode udbytter.

15

De anvendelige carboxypeptidaser ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er L-specifikke serin- eller thiolcarboxypeptidaser. Sådanne enzymer kan produceres af gærsvampe, eller de kan være af animalsk, vegetabilsk eller mikrobiel
20 oprindelse.

Et særligt velegnet enzym er carboxypeptidase-Y fra gærsvampe (CPD-Y). Dette enzym er bl.a. beskrevet i DK-ans 5202/80, bl.a. under henvisning til Johansen et al.
25 (Ref. 8), der udviklede en særligt hensigtsmæssig rensningsmetode ved affinitetskromatografi på en affinitetsresin omfattende et polymert resinskelet med tilkoblede benzylsuccinylgrupper. CPD-Y, der er et serinenzym, udmerker sig ved at have de ovennævnte relationer mellem
30 de forskellige enzymatiske aktiviteter ved pH 9 og ved ikke at udvise endopeptidaseaktivitet. En anden fordel ved CPD-Y er, at det er tilgængeligt i store mængder og udviser en relativt høj stabilitet. Yderligere detaljer er angivet i Ref. 7 og 11.

35

Foruden CPD-Y, der er det foretrukne enzym for nærværende,

kan fremgangsmåden ifølge opfindelsen gennemføres med andre carboxypeptidaser, f.eks. de nedenstående:

<u>Enzym</u>	<u>Oprindelse</u>
5	<u>Svampe</u>
Penicillocarboxypeptidase S-1	Penicillium janthinellum
" S-2	" "
Carboxypeptidase(r) fra	Aspergillus saitoi
"	Aspergillus oryzae
10	<u>Planter</u>
Carboxypeptidase(r) C	Orangeblade
	Orangeskaller
Carboxypeptidase C _N	Citrus natsudaidai Hayata
Phaseolain	Bønneblade
15 Carboxypeptidase(r) fra	Spirende byg
	Spirende bomuldsplanter
	Tomater
	Vandmelon
	Bromelain (ananas) pulver

20

Det nære slægtskab mellem en række af de ovennævnte carboxypeptidaser er diskuteret af Kubota et al. (Ref. 12).

25 Fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan i princippet gennemføres med et hvilket som helst naturligt, semisyntetisk eller syntetisk insulin som substratkomponent.

30 Det skal nævnes, at ioniserbare grupper, der er til stede i de enkelte aminosyrer, der indgår i insulinudgangsmaterialet, om ønsket kan blokeres på i og for sig kendt måde afhængig af gruppens art. Dette er imidlertid absolut ikke nødvendigt, hvilket netop er en af fordelene ved den omhandlede fremgangsmåde. Hvis af en eller anden årsag det skulle være ønskeligt at beskytte de funktionelle grupper,

35 kan egnede beskyttelsesbrupper vælges som anført i den ovennævnte DK-ans. 5202/80.

Den anden reaktionsdeltager er den såkaldte aminkomponent, der kan vælges som anført i krav 1's kendetegnende del.

5 Den aminosyre, der indgår i aminkomponenten, kan være en hvilken som helst af de kendte aminosyrer, f.eks. Leu, Ile, Ala, Gly, Ser, Val, Thr, Lys, Arg, Asn, Glu, Gln, Met, Phe, Tyr, Trp eller His.

10 I denne sammenhæng betegner "alkyl" ligekædet eller forgrenet alkyl, fortrinsvis med 1-6 carbonatomer, såsom methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, tert.butyl, amyl, hexyl, etc.

15 Gruppen OR^3 er fortrinsvis valgt blandt methoxy, ethoxy eller t-butoxy.

Som anført i krav 1's kendetegnende del gennemføres fremgangsmåden ifølge opfindelsen ved pH 7,0 - 10,5, fortrinsvis ved pH 7,5 - 10,5. Den foretrukne pH-værdi, 20 der ofte ligger inden for et meget snævert interval, afhænger af henholdsvis pH-optima og pH-minima for det anvendte enzyms forskellige enzymatiske aktiviteter, idet det er underforstået, at pH-værdien skal vælges således, at aktiviteterne er indbyrdes afstemt som forklaret 25 ovenfor.

Hvis CPD-Y anvendes som enzym, er pH-værdien fortrinsvis 7,5 - 10,5, især 9,0 - 10,5, som nærmere forklaret nedenfor. Imidlertid er en lav pH-værdi inden for det foretrukne område, såsom ca. 7,5, særligt velegnet, hvis 30 man ønsker at isolere et insulinamid-mellemprodukt.

Den valgte pH-værdi bør fortrinsvis opretholdes under hele koblingsreaktionen, og kan derpå ændres til udfældning af reaktionsproduktet, fraspaltning af beskyttelsesgrupper, etc. Man kan også vælge et pH, ved hvilket 35

enzymet udviser amidaseaktivitet, og derved forebygge en udfældning af det dannede insulinamid og således bidrage på fordelagtig vis til dannelsen af det ønskede insulin i ét trin. Tilsvarende kan man vælge et pH, 5 hvor enzymet overvejende udviser peptidase-aktivitet og derved favoriserer dannelsen af stabile insulinamid-mellemprodukter.

pH-kontrollen kan f.eks. opnås ved inkorporering af 10 en passende puffer for det ønskede pH-område i reaktionsmediet, såsom en bicarbonatpuffer.

pH-værdien kan også opretholdes ved tilsætning af en syre, såsom HCl, eller en base, såsom NaOH, under reaktion. Dette kan bekvemt gøres ved anvendelse af en 15 pH-stat.

På basis af informationen givet ovenfor og i Ref. 7 og 11, vil fagmanden være i stand til at udvælge de 20 mest velegnede reaktionsbetingelser, især med hensyn til den pH-værdi, ved hvilken de forskellige enzymatiske aktiviteter (amidase, peptidase, esterase, carboxypeptidase og peptidyl-aminosyre-amid hydrolase) bedst kan udnyttes i afhængighed af insulin-substratkomponenten, 25 aminkomponenten og ønsket om at undertrykke eller favorisere dannelsen af mellemprodukter.

I reglen fremmer lave pH-værdier indenfor det ovennævnte interval dannelsen og udfældningen af et insulinamid- 30 mellemprodukt, mens højere værdier fører til en fraspaltning af amidgruppen på grund af carboxypeptidasens mere udtalte amidaseaktivitet.

Imidlertid kan disse betingelser også påvirkes ved variation af enzymkoncentrationen, reaktionstiden, etc. 35

Reaktionen gennemføres som nævnt i et vandigt reaktionsmedium, der om ønsket kan indeholde op til 50% af et organisk opløsningsmiddel. Foretrukne organiske opløsningsmidler er alkanoler, f.eks. methanol og ethanol, glycoler, f.eks. ethylenglycol eller polyethylenglycoler, dimethylformamid, dimethylsulfoxid, tetrahydrofuran, dioxan og dimethoxyethan.

Valget af reaktionsmediets sammensætning afhænger især af opløseligheden, temperaturen og pH for reaktionskomponenterne og de involverede insulinprodukter, samt af enzymets stabilitet.

Reaktionsmediet kan også indeholde en komponent, som gør enzymet uopløseligt, men bibeholder en væsentlig del af enzymaktiviteten, såsom en ionbytterharpiks. Alternativt kan enzymet immobiliseres på i og for sig kendt måde, jfr. Methods of Enzymology, Vol. 44, 1976, f.eks. ved binding til en matrix, såsom en tværbunden dextran eller agarose, eller til en silica, et polyamid eller cellulose, eller ved indkapsling i polyacrylamid, alginater eller fibre. Endvidere kan enzymet modificeres ad kemisk vej til forbedring af dets stabilitet eller enzymatiske egenskaber.

Hvis man ønsker at undertrykke enhver udfældning af insulinamid-mellemprodukter, kan reaktionsmediet også indeholde urinstof eller guanidin-hydrochlorid i koncentrationer på op til 3 molær. Dette kan også være fordelagtigt ved pH-værdier og i medier, hvor insulin-substratkomponenten har begrænset opløselighed.

Koncentrationen af de to reaktionsdeltagere kan variere inden for vide grænser, som forklaret nedenfor. En foretrukken udgangskoncentration for insulinsubstratkomponenten er 0,002 - 0,05 molær og for aminkomponenten 0,05 - 3 molær.

Enzymaktiviteten kan ligeledes variere, men er fortrinsvis 10^{-6} - 10^{-4} molær, især 10^{-5} molær. Den mest hensigtsmæssige aktivitet afhænger bl.a. af substratkoncentrationen, aminkoncentrationen og reaktionstiden.

5

Reaktionstemperaturen ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er fortrinsvis 20-40°C. Den mest hensigtsmæssige reaktionstemperatur ved en given syntese kan fastlægges ved forsøg, men afhænger især af den anvendte aminkomponent og enzymkoncentrationen. En passende temperatur er sædvanligvis ca. 20-30°C, fortrinsvis ca. 25°C. Ved temperaturer under 20°C vil reaktionstiden sædvanligvis være u hensigtsmæssig lang, mens temperaturer over 40°C ofte forårsager problemer med stabiliteten af enzymet og/eller reaktanterne eller reaktionsprodukterne.

10

15

Lignende variationer findes for reaktionstiden, der afhænger meget af de andre reaktionsparametre, især enzymkoncentrationen. Standardreaktionstiden ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ca. 2-6 timer.

20

Det skal nævnes, at det, når man anvender et amid som aminkomponent, normalt er ønskeligt at fraspalte amidgruppen specifikt fra det dannede insulinamid. Også i denne henseende er carboxypeptidasen, især CPD-Y, meget egnet, eftersom CPD-Y som beskrevet ovenfor udviser amidaseaktivitet ved pH >9, hvor carboxypeptidaseaktiviteten er negligerbar.

25

På tilsvarende måde kan carboxypeptidasen generelt anvendes til fraspaltning af estergrupperne OR^3 fra det dannede insulinester-mellemprodukt til opnåelse af et insulin-slutprodukt, der ikke er C-terminalbeskyttet.

30

Før fremgangsmåden ifølge opfindelsen illustreres nærmere ved eksempler, vil udgangsmaterialerne, målemetoderne, etc. blive omtalt.

35

UDGANGSMATERIALER

Svineinsulin blev leveret af Nordisk Insulinlaboratorium, København. Carboxypeptidase Y fra bagerigær, et kommer-
5 cielt produkt fra Carlsberg Bryggerierne, blev isoleret ved en modificering af affinitetschromatografifremgangs-
måden ifølge Johansen et al. (Ref. 8) og opnået som et lyofiliseret pulver (10% enzym i natriumcitrat). Inden
brugen blev enzymet afsaltet på en "Sephadex[®] G-25" ko-
10 lonne (1,5 x 25 cm) ækvilibreret og elueret med vand. Enzymkoncentrationen bestemtes spektrofotometrisk ved $E_{280\text{ nm}}^{1\%} = 14,8$. Det anvendte enzympræparat var fri for Protease A bestemt ifølge Lee og Riordan (Ref. 9). L-threoninamid blev indkøbt hos Vega-Fox, Arizona, USA.
15 L-threoninmethylester fra Fluka, Schweiz og L-threonin, Dansyl chlorid, carboxypeptidase A og trypsin fik man fra Sigma, USA. Chromatografiske materialer var fra Pharmacia, Sverige. Alle andre reagenter og opløsningsmidler var af analytisk renhedsgrad fra Merck, BRD.

20

AMINOSYREANALYSER

Prøver til aminosyreanalyse blev hydrolyseret i 6M HCl ved 110°C i vakuum i 24 timer og analyseret på en Durrum
25 D-500 aminosyreanalysator. Aminosyresammensætningen var baseret på det kendte indhold af asparaginsyre og glycin. Thr, Lys og Ala er de eneste aminosyrer, der påvirkes af reaktionerne. Værdierne af disse aminosyrer for svine-
(human) insulin er: Thr = 1,93 (2,87), Lys = 0,97 (0,98)
30 og Ala = 2,00 (1,05). Mængden af uomodannet svineinsulin i reaktionsblandingen blev bestemt ud fra alaninanalyse af "insulinpoolen" efter chromatografi på "Sephadex G-50". Koblingsudbyttet angives som mængden af et givet produkt divideret med mængden af det totale insulinforbrug i
35 reaktionen.

CARBOXYPEPTIDASE A NEDBRYDNINGER (Eksempel 2 og 3 nedenfor)

Til 100 μ l af en opløsning af insulin eller insulinderivater (0,7 mg/ml) i 0,1M tris-HCl, pH 7,5, sættes 10 μ g carboxypeptidase A. Efter nedbrydning ved stuetemperatur i 6 timer standsedes reaktionen ved tilsætning af et tilsvarende rumfang 0,5M HCl, og de frigivne aminosyrer bestemtes ved aminosyreanalyse.

10 ENZYMATISK NEDBRYDNING AF INSULINDERIVATER (eksempel 4)

Nedbrydning af forskellige insulinderivater med carboxypeptidase A og Y udførtes i en 0,05 M Tris puffer, pH 7,5 ved stuetemperatur under anvendelse af ca. 0,5 mM insulin og 5 μ M carboxypeptidase. Reaktions tiden var 3 timer med CPD-A og 1,5 time med CPD-Y. Under disse betingelser opnåedes den maksimale frigivelse af C-terminal aminosyre. Efter at reaktionsblandingen var blevet gjort sur med HCl, anvendtes de udtagne mængder direkte i aminosyreanalysatoren.

Aminosyresekvensen i den C-terminale del af de forskellige insulinderivater bestemtes efter trypsinnedbrygning og reaktion af det nedbrudte materiale med Dansylchlorid, efterfulgt af identificering af Dansylpeptider. Nedbrydning af insulinderivater med trypsin udførtes i 0,1M NaHCO₃ ved pH-værdi 8,2 under anvendelse af 1 mM insulin, 40 μ M DPCC-trypsin og en inkubationstid på 1 time. Forudgående forsøg på svineinsulin havde vist, at disse betingelser var tilstrækkelige til fuldstændig frigørelse af den C-terminale aminosylrest fra B-kæden. De frigjorte aminosyrer eller dipeptider blev dansyleret som følger: Til en 100 μ l prøve af trypsin-nedbrydningsblandingen sættes 100 μ l 0,5M HCl, hvorved nedbrydningen standsede. Prøven blev inddampet til tørhed og genopløstes i 100 μ l 0,1M NaHCO₃, pH-værdi 8,2. 100 μ l Dansylchlorid (5 mg/ml) i

acetone tilsattes, og reaktionsblandingen inkuberedes i 2 timer ved 37°C. Reaktionsblandingen blev analyseret ved HPLC ved hjælp af et Waters væskechromatografi-system, der bestod af en Model U6K injector, 2 Model 6000 A pumper, en Model 660 Solvent Programmer, en Model 450 UV detector, et Waters Data Modul og et Waters Radial Compression Module (RCM 100) kammer forsynet med en Waters Radial Pak A (C-18 reverse phase) kolonne.

10 Følgende standardforbindelser blev syntetiseret:

Dns-Ala-OH, Dns-Thr-OH, Dns-Ala-Thr-OH, Dns-Thr-Thr-OH, Dns-Thr-NH₂, Dns-Thr-Thr-NH₂ og Dns-Ala-Thr-NH₂. Ved at anvende den ovenfor beskrevne fremgangsmåde for dansylering af insulinbrydningsproduktet, kunne tre af disse derivater syntetiseres fra H-Ala-OH, H-Thr-OH og H-Thr-NH₂. De dansylerede dipeptider blev syntetiseret via Dns-Ala-OMe og Dns-Thr-OMe: 1 mmol H-Ala-OMe, HCl opløstes i 0,1M NaHCO₃, 5 mmol Dansylchlorid tilsattes, og reaktionsblandingen inkuberedes i 2 timer. Dns-Ala-OMe ekstraheredes fra reaktionsblandingen med ethylacetat og inddampedes til tørhed. Det påvist ved HPLC, at det isolerede produkt var rent. Samme fremgangsmåde anvendtes ved syntetisering af Dns-Thr-OMe. Ved anvendelse af fremgangsmåderne til enzymatisk peptidsyntese svarende til de tidligere beskrevne (Ref. 7 og 11) kobledes disse to forbindelser dernæst til H-Thr-OH, der gav Dns-Ala-Thr-OH og Dns-Thr-Thr-OH, og H-Thr-NH₂, der gav Dns-Ala-Thr-NH₂ og Dns-Thr-Thr-NH₂. Betingelserne var følgende: 5 mM substrat, 0,5M nucleophil, 0,1M KCl, 2mM EDTA, 1,0 μM CPD-Y, pH 9,0, 10% ethanol. Alle syv Dansylderivater kunne nemt adskilles ved HPLC ved brug af to forskellige programmer.

35 Opfindelsen illustreres nærmere på tegningerne, hvor

Fig. 1 viser reaktionsforløbet, når svineinsulin omsættes med L-Threoninamid med CPD-Y som katalysator. Aminogyreanalysen er afbildet mod reaktionstiden.

- 5 Fig. 2 viser det tilsvarende reaktionsforløb, når L-Threonin-methylester anvendes som aminkomponent.

Fig. 3 viser en elueringsprofil fra en ionbytningschromatografi af reaktionsproduktet mellem svineinsulin og threoninamid.

10

EKSEMPEL 1 (Baggrundsundersøgelser)

Svineinsulin inkuberedes med carboxypeptidase-Y ved 25°C og pH 5 - 7, der er et pH-område, hvor enzymet udviser maksimal peptidaseaktivitet. Derved frigjordes følgende aminosyrer fra C-terminalen af B-kæden: 1,0 Alanin, 1,0 Lysin, 1,0 Prolin, 1,0 Threonin, 1,0 Tyrosin og 2,0 Phenylalanin. Ved stilling B-23 (glycin) standser carboxypeptidase Y, og man kan således opnå en fuldstændig frigivelse af de første 7 aminosyrer i B-kæden i insulin. Overraskende nok frigives C-terminal asparagin (A-21) i A-kæden overhovedet ikke. Ved pH 9,5 frigives C-terminal alanin fra B-kæden meget hurtigere end de efterfølgende aminosyrer. Da det rensede CPD-Y præparat var fri for protease A (endopeptidase) i modsætning til mange kommercielt tilgængelige præparater fra andre kilder, hydrolyseredes (B-15-16) Leu-Tyr bindingen ikke, hvilket er af stor vigtighed.

15
20
25
30

EKSEMPEL 2 (Omdannelse af svineinsulin til human insulin ved anvendelse af threoninamid som aminkomponent uden isolation af insulinamid-mellemprodukter)

35 Til en opløsning af zinkfri svineinsulin (2 mM) i 10 mM EDTA, 0,1M KCl indeholdende 0,5M L-Threonin-amid ved

pH 9,5 og 25°C sattes carboxypeptidase-Y (50 μ M). Reaktionenens pH blev holdt konstant ved tilsætning af 0,5M NaOH under anvendelse af en pH-stat. Til kontrol af reaktionsforløbet udtoges prøver på forskellige tidspunkter, og reaktionen standsedes ved tilsætning af 6M HCl, således at pH blev indstillet til 1-2. Prøven kromatograferedes på "Sephadex[®] G-50" (1 x 30 cm) ækvilibreret med 1M eddikesyre for at separere insulin fra enzym og fri aminosyrer. De insulinholdige fraktioner lyofiliseredes, og aminosyresammensætningen bestemtes som beskrevet ovenfor.

Reaktionsforløbet er vist på fig. 1. fra aminosyreanalysen beregnedes, at threoninindholdet forøgedes med 0,7 mol pr. mol insulin, mens der forsvandt 0,8 mol alanin sammen med 0,2 mol lysin (fig. 1). Af disse resultater ses det, at efter 6,5 timers reaktion er 20% af svineinsulinet uomsat, mens 20% af insulinet foruden alanin også har mistet den følgende aminosyre lysin. Tabet af 0,8 mol alanin blev ledsaget af inkorporering af 0,7 mol threonin.

Reaktionsprodukterne blev yderligere analyseret ved carboxypeptidase A-nedbrydning. Carboxypeptidase A frigiver kun aminosyrer med frie α -carboxylgrupper og frigiver ikke lysin. I overensstemmelse med denne specificitet frigiver carboxypeptidase A-nedbrydning af svineinsulin kun alanin og asparagin fra de C-terminale ender af henholdsvis B-kæden og A-kæden. Således skulle inkubering af prøven opnået efter 6,5 timers reaktion (fig. 1) foruden asparagin kun frigive alanin i en mængde svarende til fraktionen af uomsat svineinsulin. Overraskende frigives foruden alanin også threonin i mængder ækvivalent med det inkorporerede threoninamid til dannels af mellemproduktet human insulinamid. Dette må skyldes, at carboxypeptidase-Y foruden sin peptidase- og esteraseaktivitet også udviser peptidamid-hydrolaseaktivitet,

- jfr. Ref. 11. Tilsyneladende bliver det C-terminale alanin under reaktionen af svineinsulinet i nærværelse af carboxypeptidase-Y først udskiftet med threoninamid i en transpeptideringsreaktion til dannelse af humant insulinamid, som derpå hydrolyseres af carboxypeptidase-Y til dannelse af human insulin i et totalt udbytte på ca. 60%, 20% uomsat svineinsulin og 20% er andre nedbrydningsprodukter. Andre eksperimenter har bekræftet denne reaktionssekvens. Ved anvendelse af mindre enzygmængder eller kortere reaktionstider viser carboxypeptidase A-nedbrydning af reaktionsprodukterne en mindre threoninfrigivelse sammenlignet med threonininkorporering, d.v.s. at der overvejende dannedes humant insulinamid.
- 15 For at separere reaktionsprodukterne underkastedes en prøve opnået efter 6,5 timers reaktion (fig. 1) HPLC under anvendelse af en "Lichrosorb RP-18", 5 μ m, reverse phase kolonne (0,4 x 30 cm) og en Waters Model 6000A pumpe og model 450 UV detektor, der arbejdede ved 220 nm. Eluenten var 28,75% CH₃CN i 5 mM tartratpuffer, pH 3,0, indeholdende 5 mM nBu-SO₃Na og 50 mM Na₂SO₄ (jfr. Inouye, Ref. 4). Flowhastigheden var 1,0 ml/min. Under anvendelse af dette system kunne human insulin og svineinsulin ikke separeres, men alle andre biprodukter fjernedes.
- 25 Aminosyreanalyse af det chromatograferede materiale er anført i tabel I. Analysen er i fremragende overensstemmelse med den sammensætning, der kunne forventes ud fra de teoretiske værdier. Indholdet af 2,6 mol threonin og 1,3 mol alanin indikerer, at prøven indeholdt ca. 70% human insulin og ca. 30% svineinsulin.
- 30

TABEL IAminosyresammensætning af insulin

Aminosyre	<u>Mol aminosyre</u> <u>Mol insulin</u>	<u>Sekvens</u>	
		Svin	Human
Asparaginsyre	3,1	3	3
Threonin	2,6	2	3
Serin	3,1	3	3
Glutaminsyre	7,2	7	7
Prolin	1,2	1	1
Glycin	4,0	4	4
Alanin	1,3	2	1
Valin	3,5*	4	4
Isoleucin	1,4*	2	2
Leucin	6,1	6	6
Tyrosin	3,6	4	4
Phenylalanin	3,0	3	3
Histidin	1,9	2	2
Lysin	1,0	1	1
Arginin	1,0	1	1

* Lave værdier på grund af ufuldstændig hydrolyse.

EKSEMPEL 3 (Omdannelse af svineinsulin til human insulin under anvendelse af threonin-methylester som aminkomponent uden isolering af mellemprodukter)

5

Til en opløsning af zinkfri svineinsulin (8 mM) i 10mM EDTA, 0,1M KCl indeholdende 0,5 M-L-Threonin-methylester ved pH 9,5 og 25°C sættes carboxypeptidase-Y (60 μ M). pH under reaktionen blev holdt konstant under tilsætning af 0,5M NaOH ved anvendelse af en pH-stat. For at følge reaktionen udtoges prøver på forskellige tidspunkter, og reaktionen standsedes ved tilsætning af 6M HCl, så pH indstilledes til 1 - 2.

10

15 Prøven blev kromatograferet på "Sephadex [®] G-50" (1 x 30 cm) ækvilibreret i 1M eddikesyre for at separere insulin fra enzymet og fri aminosyrer. De insulinholdige fraktioner lyofiliseredes, og aminosyresammensætningen bestemtes som beskrevet ovenfor.

20

Reaktionsforløbet er vist på fig. 2. Resultaterne af denne reaktion minder meget om de ovenfor beskrevne under anvendelse af threoninamid. Threonin inkorporeres under samtidig frigivelse af alanin og en ringe mængde lysin.

25 Carboxypeptidase A-nedbrydning af prøven efter 17 timers reaktion frigav både alanin og threonin, hvilket indikerer, at det C-terminale alanin i B-kæden først udskiftes med threonin-methylester til dannelse af human insulin-monomethylester, der derpå hydrolyseres af carboxypeptidase-Y

30 under dannelse af human insulin. Selv om reaktionen kvalitativt minder om reaktionen beskrevet ovenfor med threonin-amid, indeholder slutreaktionsblandingen kun 40% human insulin, idet 40% af svineinsulinet ikke blev omsat og 20% hydrolyseredes til andre produkter.

35

EKSEMPEL 4 (Omdannelse af svineinsulin til human insulin under anvendelse af threoninamid som aminkomponent og med isolering af insulinamidmellemprodukterne)

5

Til en opløsning af zinkfri svineinsulin (2 mM) i 2 mM EDTA, 0,1M KCl og 1,5M guanidin hydrochlorid og indeholdende 0,5M threoninamid (L-Thr-NH₂) ved pH 7,5 og 25°C sættes CPD-Y (15 µM). pH-værdien holdtes konstant under
10 reaktionen ved tilsætning af 0,5M NaOH ved brug af en pH-stat. For at følge reaktionsforløbet blev lige store prøver udtaget på forskellige tidspunkter, og reaktionen blev standset efter 2 timer ved at indstille pH-værdien til 1,5 - 2,0 med 1M HCl. Insulinfraktionen skiltes
15 fra enzymet og lavmolekylære forbindelser ved chromatografiering på "Sephadex[®] G-50 fine" (1 x 30 cm) ækvilibreret med 1M eddikesyre og blev lyofiliceret. Aminosyreanalyse på den lyofilicerede "insulin pool" som beskrevet ovenfor viste, at 78% af svineinsulinet var blevet forbrugt
20 under reaktionen.

For yderligere at analysere reaktanterne i "insulin poolen" gennemførtes ionbytningschromatografi på "DEAE-Sephadex[®] A-25" i det væsentlige som beskrevet af Morihara
25 et al. (Ref. 5). Den lyofilicerede insulinprøve (75 mg) opløstes i 0,01M Tris, 2,5M urinstof, 0,05M NaCl, pH 7,5 og påførtes en "DEAE Sephadex[®] A-25" kolonne (2,5 x 25 cm) ækvilibreret med den samme puffer. Insulinet blev elueret med en NaCl gradient fra 0,05 til 0,30M
30 i den samme puffer og 8 ml fraktioner opsamledes på en "Sephadex[®] G-25" kolonne og blev lyofiliceret.

Elueringsprofilen er vist i fig. 3, hvor tre toppe kan observeres. Desuden er aminosyresammensætningerne for
35 de enkelte toppe og topsammensætningerne som resultat af nedbrydningsforsøg udført med CPD-Y og CPD-A som

beskrevet ovenfor. Da kun C-terminalen af B-kæden i insulin er involveret i disse reaktioner anvendes -Pro-Lys-Ala-OH som forkortelse for svineinsulin. Andre insulinlinderivater forkortes også tilsvarende: -Pro-Lys-Thr-OH = human insulin, -Pro-Lys-Thr-NH₂ = human insulinamid, etc. Det ses, at ved pH-værdien 7,5, der blev brugt i reaktionen, og hvor amidaseaktiviteten for CPD-Y almindeligvis er lavere end peptidaseaktiviteten, er det dannede peptidamid tilstrækkelig stabilt, da toppen I omfattede ca. 20% af den totale "insulin pool". Ca. 75% af svineinsulinudgangsmaterialet blev omdannet i reaktionen. Da imidlertid threoninindholdet i toppen I (3,65) er større end de 3,0 i human insulin, er det tydeligt, at det oprindelige transpeptideringsprodukt (-Pro-Lys-Thr-NH₂) ikke er tilstrækkelig stabilt til at undgå en oligomerisering under dannelse af (-Pro-Lys-Thr-Thr-NH₂).

Denne dannelse af en blanding af amid-mellemprodukter kunne umiddelbart indicere, at homogent human insulin ikke ville blive dannet ved de tidligere beskrevne deamideringstrin ved hjælp af CPD-Y, da det kunne forventes, at deamideringen ville resultere i en blanding af -Pro-Lys-Thr-OH og -Pro-Lys-Thr-Thr-OH. Når imidlertid top I i blandingen underkastedes en deamideringsbehandling med 10 µM CPD-Y ved pH 10,0 i 0,1M HCl, 2mM EDTA i 20 minutter opnåedes overraskende næsten ren human insulin. Forsøget forløb som følger:

Efter at det omsatte insulin var skilt fra enzymet og det lavmolekylære materiale ved chromatografi på "Sephadex[®] G-50", chromatograferes materialet på "DEAE Sephadex[®] A-25" ved at anvende fremgangsmåder, der er identiske med de ved fig. 3 angivne. Reaktionsproduktet elueredes som top II som forventet, mens uomsat materiale (<10%) elueredes som top I. Der var ingen

top III, d.v.s. der dannedes ingen insulinderivater uden lysin. Som vist i resultaterne i Tabel II nedenfor opnået med CPD-A, CPD-Y og trypsinbrydning, var kun threoninindholdet væsentligt påvirket af disse reaktioner. Dette er i overensstemmelse med den forventede mangel på peptidaseaktivitet for CPD-Y ved denne pH-værdi.

Aminosyresammensætningen af top II fra deamideringsreaktionen ligger tæt på analysen for human insulin:
10 Thr = 2,87, Ala = 1,05, Lys = 0,98. Nedbrydningen af deamideret produkt med CPD-Y, CPD-A og trypsin viser, at prøven indeholdt 90-95% rent human insulin. Dette indikerer, at insulinderivatet -Pro-Lys-Thr-Thr-NH₂ reagerer næsten udelukkende via peptidyl-aminosyre-amid-
15 hydrolaseaktiviteten, mens -Pro-Lys-Thr-NH₂ reagerer overvejende via amidaseaktiviteten. Det totale udbytte ved omdannelsen af svineinsulin til human insulin er ca. 30% beregnet på mængden af omdannet insulin.

TABEL II

Aminosyresammensætning af toppene I, II og III i fig. 3
og top II opnået efter deamideringsbehandling af top I
fraktionen

	Top I	Top II	Top III	Top II op- nået efter deamidering af Top I
Asparaginsyre	2,99	2,99	3,01	3,01
Threonin	3,62	2,52	2,50	2,79
Serin	2,93	2,92	2,92	2,93
Glutaminsyre	6,88	7,16	7,18	7,01
Prolin	1,00	0,98	0,71	0,87
Glycin	4,00	4,00	4,00	4,00
Alanin	1,16	1,52	1,03	1,09
Valin	2,42	2,82	2,81	2,50
Ileucin	0,94	1,04	1,09	1,19
Leucin	5,80	6,21	6,18	6,10
Tyrosin	3,80	3,86	3,67	4,02
Phenylalanin	2,74	2,82	2,65	2,64
Histidin	1,96	1,90	1,93	1,89
Lysin	0,99	0,74	0,06	1,01
Arginin	0,96	1,00	0,98	0,89

EKSEMPEL 5

Til en opløsning af zinkkrystalliseret svineinsulin
(7 mg/ml) i 1,0M threoninamid, pH 6,9, sættes carboxy-
peptidase P fra *Penicillium janthinellum* til en slut-
5 koncentration på 0,42 mg/ml. Efter 2,5 timers reaktions-
tid var 50% af svineinsulinet omdannet til human insulin
(bestemt ved HPLC).

REFERENCER

1. Ruttenberg, M.A.: Human insulin: Facile synthesis by modification of porcine insulin, *Science* 177, 623-6.
2. Gattner, H.-G., Schmitt, E.W., Naithani, V.K., in
5 Semisynthetic peptides and proteins, Eds. RE Offord and C-Di Bello, Academic Press, New York 1978, 181.
3. Obermeier, R., Geiger, R. (1976), Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.*, 357, 759-67.
4. Inouye, K., Watnabe, K., Morihara, K., Tochino, Y.,
10 Kanaya, T., Emura, J.: Enzyme-assisted semisynthesis of human insulin, *Journal of the American Chemical Society*, 1979.
5. Morihara, V.: Semi-synthesis of human insulin by trypsin-catalysed replacement of Ala-B30 by Thr in porcine
15 insulin, *Nature*, Vol. 280, No. 5721, 1979, 412-13.
6. Morihara, K., Oka, T., Tsuzuki, H., Tochino, Y., Kanaya, T.: *Achromobacter* protease I-catalyzed conversion of porcine insulin into human insulin, *Biochemical and Biophysical Research Comm.* Vol. 92,
20 No. 2, 1980, 396-402.
7. Widmer, F., Johansen, T.J.: Enzymatic peptide synthesis carboxypeptidase Y catalyzed formation of peptide bonds, *Carlsberg Res. Commun*, Vol. 44, 1979, 37-46.
8. Johansen, J.T., Breddam, K., Ottesen M.: Isolation of
25 Carboxypeptidase Y by affinity chromatography, *Carlsberg Res. Commun.*, Vol. 41, No. 1, 1976, 1-13.
9. Lee, H.-M., Riordan, J.F.: Does carboxypeptidase Y have intrinsic endopeptidase activity?, *Biochemical and Biophysical Research Comm.*, Vol. 85, No. 3, 1978,
30 1135-1142.
10. Obermeier, Rainer: Des-octapeptide-(B23-30)-insulin, starting material for human insulin and analogues; studies on synthesis purification and properties, Eds. RE Offord and C-Di Bello, Academic Press, New York
35 1978, 201-11.

11. Breddam, K., Widmer, F., Johansen, J.T.: Carboxypeptidase Y catalyzed transpeptidations and enzymatic peptide synthesis, Carlsberg Res. Comm. Vol. 45, 4. november 1980, p. 237-247.
12. Kubota et al., Carboxypeptidase C_N, J. Biochem., Vol. 74, No. 4 (1973), p. 757-770.

P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåde til enzymatisk udskiftning af B-30
aminosyren i insuliner,

5 k e n d e t e g n e t ved, at man omsætter et insulin
Ins-X, hvori X betegner B-30 aminosyren, som substrat-
komponent med en aminkomponent valgt blandt aminosyre-
amider med formlen

10
$$H - B - NH_2$$

hvori B betegner en aminosyrerest, og aminosyreestere
med formlen

15
$$H - B - OR^3$$

hvori B betegner en aminosyrerest, og R^3 betegner alkyl,
i nærvær af et L-specifikt serin- eller thiolcarboxypep-
tidase-enzym i en vandig opløsning eller dispersion
20 ved pH ca. 7 - 10,5 til dannelselse af et insulinderivat

$$Ins-B-NH_2, Ins-B-B-NH_2 \text{ eller } Ins-B-OR^3$$

25 hvorefter man om ønsket fraspalter en gruppe $-NH_2$, $-B-NH_2$
eller $-OR^3$, fortrinsvis ved hjælp af et carboxypeptidase-
enzym.

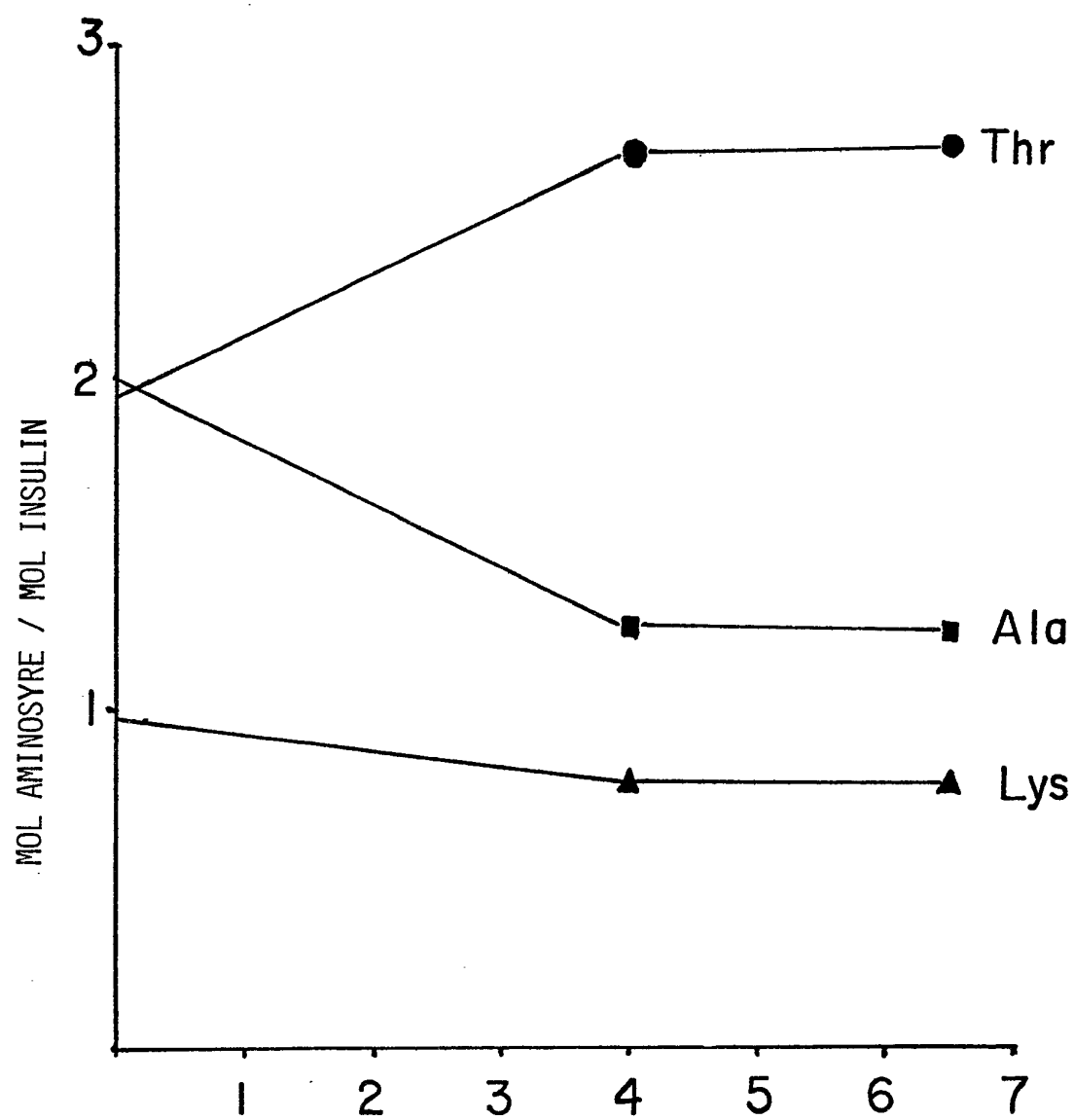
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at man som carboxypeptidase-
30 enzym anvender carboxypeptidase-Y fra gær.

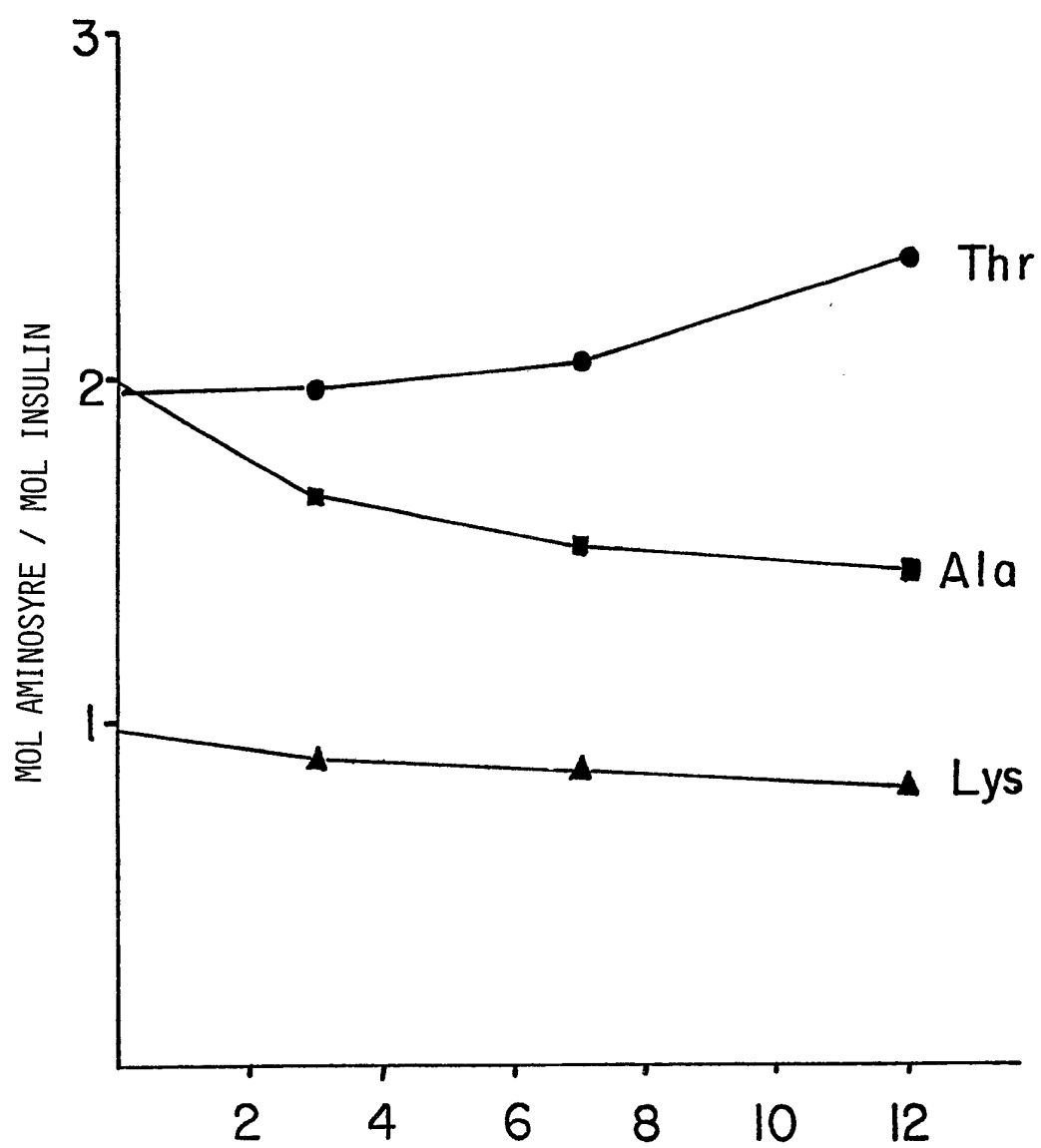
3. Fremgangsmåde ifølge krav 2,
k e n d e t e g n e t ved, at man anvender en carboxy-
peptidase-Y, der er rensat ved affinitetschromatografi
35 på en affinitetsresin bestående af en polymer resinmatrix,
hvortil der er koblet benzylsuccinylgrupper.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at man anvender et immobili-
seret carboxypeptidaseenzym.
- 5 5. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1-4,
k e n d e t e g n e t ved, at man anvender en vandig
reaktionsopløsning indeholdende fra 0 til 50% organisk
opløsningsmiddel.
- 10 6. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1-5,
k e n d e t e g n e t ved, at man anvender en vandig
opløsning indeholdende urinstof eller guanidin-hydrochlorid
i en koncentration på op til 3 molær.
- 15 7. Fremgangsmåde ifølge ethvert af de foregående krav,
k e n d e t e g n e t ved, at der som substratkomponent
anvendes svineinsulin, og som den aminosyre, der indgår
i aminkomponenten, anvendes threonin.

Fremdragne publikationer:

F.Widmer & J.T.Johansen: Enzymatic Peptide Synthesis
Carboxypeptidase y Catalyzed Formation of Peptide
Bonds, Carlsberg Res.Comm., bind 44, 23.apr.1979,
side 37-46.

**Fig. 1**

**Fig.2**

AMINOSYRESAMMENSETNING

	POOL	TOP I	TOP II	TOP III
THR	2,55	3,65	2,52	2,50
ALA	1,22	1,09	1,52	1,02
LYS	0,55	0,99	0,74	0,06
AREAL (%)		21	61	18

TOPSAMMENSETNING:

- TOP I: 65% -PRO-LYS-THR-THR-NH₂
35% -PRO-LYS-THR-NH₂
TOP II: 52% -PRO-LYS-ALA-OH
26% -PRO-LYS-THR-OH
22% -PRO-THR-NH₂
TOP III: NEDBRYDNINGSPRODUKTER

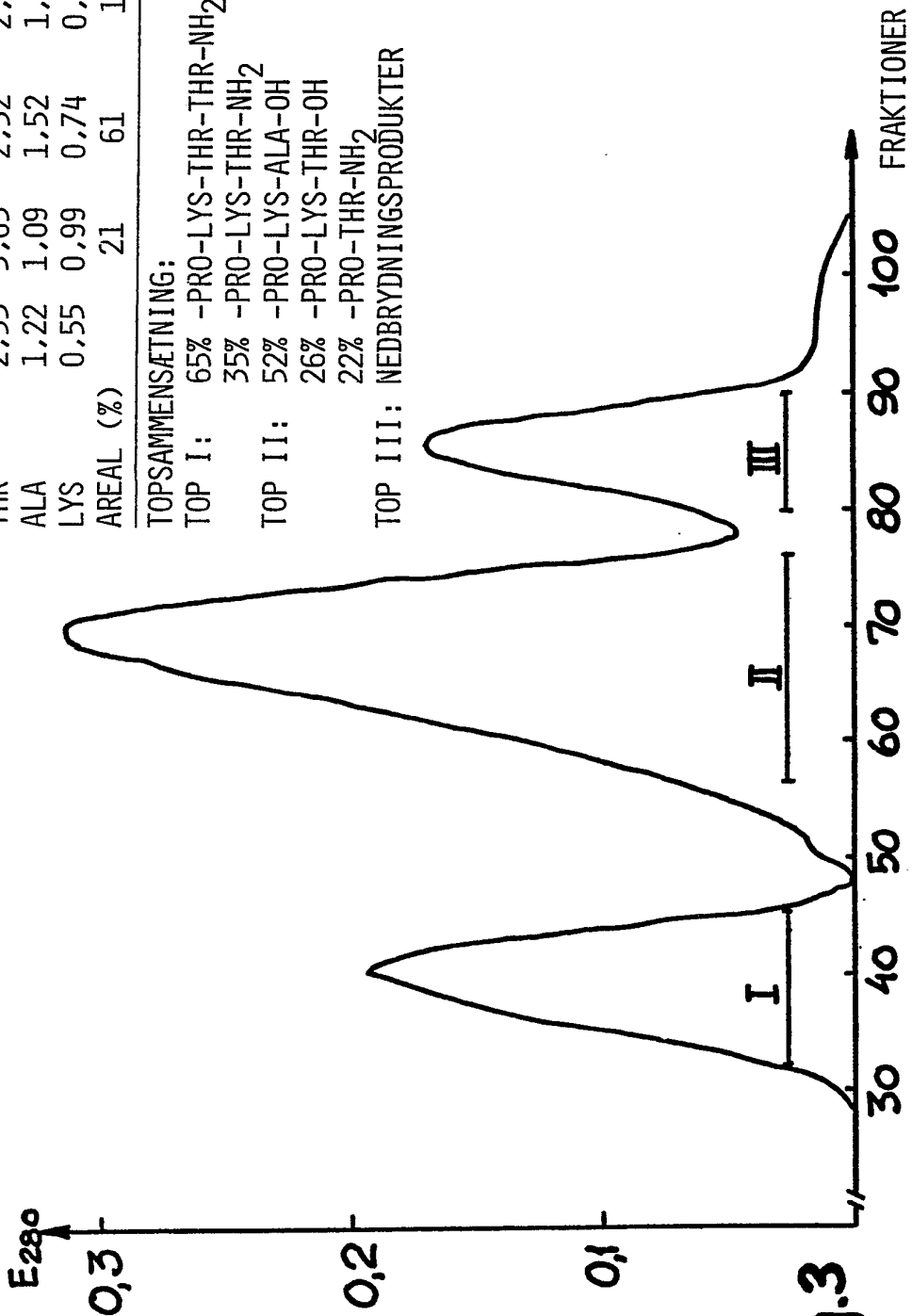


Fig.3