



NORGE

(19) [NO]

STYRET FOR DET
INDUSTRIELLE RETTSVERN

[B] (12) **UTLEGNINGSSKRIFT** (11) **NR. 156247**

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

(21) Patentsøknad nr. 810443

(22) Inngivelsesdag 10.02.81

(24) Løpedag 10.02.81

(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr.

(71)(73) Søker/Patenthaver **NOVO INDUSTRI A/S,**
Novo Allé,
DK-2880 Bagsværd,
Danmark.

(86) Internasjonal søknad nr. -

(86) Internasjonal inngivelsesdag -

(85) Videreføringsdag -

(41) Alment tilgjengelig fra 12.08.81

(44) Utlegningsdag 11.05.87

(72) Oppfinner **JAN MARKUSSEN, Herlev, Danmark.**

(74) Fullmektig Cand.mag. Johan H. Gørbitz,
Bryn & Aarflot A/S, Oslo.

(30) Prioritet begjært 11.02.80, Danmark, nr 574/80.

(54) Oppfinnelsens benevnelse **FREMGANGSMÅTE FOR FREMSTILLING AV HUMANINSULIN ELLER
TREONIN^{B30}-ESTERE AV HUMANINSULIN ELLER ET SALT ELLER
KOMPLEKS DERAV.**

(57) Sammendrag

Insulin og insulinlignende forbindelser fra visse arter kan i nærvær av en L-treoninester, vann, et vannblandbart organisk oppløsningsmiddel og trypsin transpeptideres til en treonin^{B30}-ester av human-insulin, fra hvilken beskyttelsesgruppen eller -gruppene kan fjernes, hvorved det fås human-insulin.

(56) Anførte publikasjoner Ingen.

Foreliggende oppfinnelse angår fremstilling av humaninsulin eller treonin^{B30}-estere av humaninsulin, eller et salt eller kompleks derav.

Til behandling av diabetes mellitus har vanligvis insulinpreparater inneholdende svine- og okseinsulin vært anvendt. Okse-, svine- og humaninsulin oppviser små forskjeller med hensyn til aminosyresammensetningen, idet forskjellen mellom human- og svineinsulin er begrenset til en enkelt aminosyre, dvs. B30-aminosyren i humaninsulin er treonin, mens den i svineinsulin er alanin. Man kan imidlertid hevde at det ideelle insulinpreparat til behandling av mennesker er insulin som har nøyaktig samme kjemiske struktur som humaninsulin.

Den nødvendige mengde human-pancreas-kjertler for fremstilling av naturlig humaninsulin er ikke tilgjengelig.

Syntetisk humaninsulin er fremstilt i liten skala med store omkostninger, jfr. Helv. Chim. Acta 57, 2617 og 60, 27. Halvsyntetisk humaninsulin er fremstilt fra svineinsulin ved langsommelige metoder, jfr. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 759 og Nature 280, 412. Foreliggende oppfinnelse angår imidlertid en fremgangsmåte som kan anvendes for fremstilling av human-insulin i industriell målestokk.

US-patentskrift 3.276.961 påstås å angå en fremgangsmåte for fremstilling av halvsyntetisk human-insulin. Utbyttet av human-insulin er imidlertid lite fordi fremgangsmåten utføres i vann, under hvilke betingelser trypsin medfører spaltning av Arg^{B22}-Gly^{B23}-bindingen, jfr. J. Biol. Chem. 236, 743.

En kjent halvsyntetisk fremgangsmåte for fremstilling av humaninsulin omfatter følgende 3 trinn: Først omdannes svineinsulin til svine-des-(Ala^{B30})-insulin ved behandling med karboksypeptidase A, jfr. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 799. I annet trinn underkastes svine-des-(Ala^{B30})-insulin en trypsinkatalysert kobling med Thr-OBu^t, hvorved det dannes Thr^{B30}-tert.butylester av humaninsulin. Til slutt behandles denne esteren med trifluoreddiksyre, hvorved man får humaninsulin, jfr. Nature 280, 412. Det første trinn resulterer imidlertid i en delvis fjernelse av Asn^{A21}, hvorved man får des-(Ala^{B30}, Asn^{A21})-insulin. Dette derivat gir etter de 2 etterfølgende reaksjoner anledning til forurensning med des-(Asn^{A21})-insulin i det fremstilte halvsyntetiske human-

insulin, hvilket er en forurensning som ikke lett kan fjernes ved kjente preparative metoder. Des-(Asn^{A21})-insulin oppviser lav biologisk aktivitet (ca. 5%), jfr. Amer. J. Med. 40, 750.

Et formål med denne oppfinnelse er tilveiebringelse av en fremgangsmåte ved hvilken ikke-human-insulin omdannes til human-insulin, eller threonin^{B30}-ester av human-insulin.

Foreliggende oppfinnelse bygger på den oppdagelse at aminosyren eller peptidkjeden som er bundet til karbonylgruppen Lys^{B29} i insulinforbindelsen, kan skiftes ut med en treoninester. Den aktuelle utskifning betegnes her en transpeptidering.

Betegnelsen "insulinforbindelser" anvendt her, omfatter insuliner og insulinlignende forbindelser inneholdende human-des(Thr^{B30})-insulindelen, i hvilke B30-aminosyren i insulinet er alanin (i insulin fra f.eks. svin, hund, finnhval og spermasethval) eller serin (kanin). Den her anvendte betegnelse "insulinlignende forbindelser" omfatter proinsulin som stammer fra en hvilken som helst av ovennevnte arter og primater, samt mellomprodukter fra omdannelsen av proinsulin til insulin. Som eksempler på slike mellomprodukter kan angis splittproinsulin, desdipeptidproinsuliner, desnonapeptidproinsulin og diarginin-insuliner, jfr. R. Chance: In Proceedings of the Seventh Congress of IDF, Buenos Aires 1970, 292-305, utg. R.R. Rodrigues & J.V.-Owen, Excerpta Medica, Amsterdam.

Ifølge oppfinnelsen tilveiebringes en fremgangsmåte for fremstilling av human-insulin eller threonin^{B30}-estere av human-insulin eller et salt eller kompleks derav fra en L-treoninester med den generelle formel II



hvor R⁴ betegner en karboksyl-beskyttelsesgruppe og R⁵ betegner hydrogen eller en hydroksyl-beskyttelsesgruppe, og en insulinforbindelse som inneholder de i human-insulin foreliggende aminosyresekvenser A1-A21 og B1-B29, i nærvær av protease. Fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse karakteriseres ved at insulinforbindelsen eller et salt eller kompleks derav, som kan omdannes dertil, omsettes med L-treonin-esteren eller et salt derav i en blanding av vann og et vannblandbart, organisk oppløsningsmiddel, idet vanninnholdet i reaksjonsblandingen er under 50% (volum/volum)

i nærvær av trypsin, modifisert trypsin eller *Achromobacter lyticus*-protease, ved en reaksjonstemperatur mellom 50°C og reaksjonsblandingens størkningspunkt, hvorefter den resulterende treonin^{B30}-ester av human-insulin om ønsket spaltes.

Selv om trypsin er best kjent for sine proteolytiske egenskaper, har fagfolk funnet ut at trypsin er i stand til å katalysere koblingen av des-(Ala^{B30})-insulin og en treonin-tert.butylester, jfr. *Nature* 280, 412.

Ved fremgangsmåten ifølge den foreliggende oppfinnelse anvendes trypsin til å katalysere transpeptidering.

Transpeptideringen kan utføres ved å oppløse

1) insulinforbindelsen, 2) en L-treoninester og 3) trypsin i en blanding av vann og minst ett vannblandbart, organisk oppløsningsmiddel, eventuelt i nærvær av en syre.

Foretrukne vannblandbare, organiske oppløsningsmidler er polare oppløsningsmidler. Som spesifikke eksempler på slike oppløsningsmidler kan angis metanol, etanol, 2-propanol, 1,2-etandiol, aceton, dioksan, tetrahydrofuran, N,N-dimetylformamid, formamid, N,N-dimetylacetamid, N-metylpyrrolidon, heksametylfosfortriamid og acetonitril.

Avhengig av hvilket vannblandbart, organisk oppløsningsmiddel som anvendes, av den valgte reaksjonstemperatur og av tilstedeværelsen av en syre i reaksjonsblanding, bør innholdet av vann i reaksjonsblanding være mindre enn ca. 50% (volum/volum), fortrinnsvis mindre enn ca. 40% (volum/volum), og mer enn ca. 10% (volum/volum).

En fordel ved å minske mengden av vann i reaksjonsblanding er at dannelsen av biprodukter derved minskes. Ved å øke mengden av syre i reaksjonsblanding, er det på tilsvarende måte mulig å minske dannelsen av biprodukt. Økning i utbytte er positivt korrelert med høy prosentandel av organisk oppløsningsmiddel.

For utførelsen av oppfinnelsen er det ikke vesentlig hvilket slag trypsin som anvendes. Trypsin er et godt karakterisert enzym som er kommersielt tilgjengelig i høy renhet, særlig fra okse- og svinekilder. Det kan videre anvendes trypsin av mikrobiell opprinnelse. For utførelsen av oppfinnelsen er heller ikke trypsinformen, f.eks. krystallinsk trypsin (oppløselig form), immobilisert trypsin eller til og med trypsinderivater (så lenge trypsinaktiviteten bibeholdes), vesentlig. Foruten trypsin kan man således også anvende modifisert trypsin eller en protease med

156247

4

trypsinlignende spesifisitet, nemlig *Acromobacter lyticus*-protease, jfr. *Agric.Biol.Chem.* 42, 1443.

Som eksempler på modifisert trypsin kan angis acetylert trypsin, succinylert trypsin, glutaraldehydbehandlet trypsin og immobiliserte trypsinderivater.

Hvis det anvendes et immobilisert trypsin, suspenderes det i mediet.

For å oppnå et egnet buffersystem kan det tilsettes organiske eller uorganiske syrer, så som saltsyre, maursyre, eddiksyre, propionsyre og smørsyre og baser så som pyridin, TRIS, N-metylmorfolin og N-etylmorfolin. Organiske syrer foretrekkes. Omsetningen kan imidlertid utføres uten slike tilsetninger. Den tilsatte mengde syre er vanligvis mindre enn ca. 10 ekvivalenter pr. ekvivalent L-treoninester. Mengden av syre er fortrinnsvis mellom 0,5 og 5 ekvivalenter pr. ekvivalent L-treoninester. Det kan tilsettes ioner som stabiliserer trypsin, så som kalsiumioner.

Fremgangsmåten utføres ved en temperatur i området mellom 50°C og reaksjonsblandingens størkningspunkt. For å oppnå en tilstrekkelig reaksjonshastighet utføres enzymatiske reaksjoner med trypsin vanligvis ved ca. 37°C. For å unngå inaktivering av trypsin er det imidlertid fordelaktig å utføre fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse ved en temperatur under romtemperatur. I praksis foretrekkes reaksjonstemperaturer over ca. 0°C.

Avhengig av reaksjonstemperaturen, av den tilsatte mengde trypsin og av andre reaksjonsbetingelser er reaksjonstiden vanligvis mellom flere timer og flere dager.

Vektforholdet mellom trypsin og insulinforbindelsen i reaksjonsblandingen er vanligvis over ca. 1:200, fortrinnsvis over ca. 1:50 og under ca. 1:1.

De L-treoninestere som anvendes ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen, kan angis ved den generelle formel II:



hvor R^4 betegner en karboksyl-beskyttelsesgruppe og R^5 betegner hydrogen eller en hydroksyl-beskyttelsesgruppe,

eller et salt derav.

De treonin^{B30}-estere av humaninsulin som erholdes ved transpeptideringen, kan angis ved den generelle formel III:



hvor h-In betegner human-des-(Thr^{B30}) insulindelen og R⁴ og R⁵ har den ovenfor angitte betydning.

Anvendelige L-treonin-estere med formel II er slike hvor R⁴ er en karboksyl-beskyttelsesgruppe som kan fjernes fra treonin^{B30}-esteren av humaninsulin (formel III) under betingelser som ikke medfører vesentlig, irreversibel endring i insulinmolekylet. Som eksempler på slike karboksyl-beskyttelsesgrupper kan angis lavere alkyl, f.eks. metyl, etyl og tert.butyl, substituert benzyl så som p-metoksybenzyl og 2,4,6-trimetylbenzyl og difenylmetyl, og grupper med den generelle formel $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{R}^6$ hvor R⁶ betegner lavere alkyl så som metyl, etyl, propyl og n-butyl. Egnede hydroksyl-beskyttelsesgrupper R⁵ er slike som kan fjernes fra treonin^{B30}-esteren av humaninsulin (formel III) under betingelser som ikke medfører vesentlig, irreversibel endring i insulinmolekylet. Som et eksempel på en slik gruppe (R⁵) kan angis tert.butyl.

Lavere alkylgrupper inneholder mindre enn 7 karbonatomer, fortrinnsvis mindre enn 5 karbonatomer.

Ytterligere, vanlig anvendte beskyttelsesgrupper er beskrevet av Wünsch: Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl), vol. XV/1, utg.: Eugen Müller, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974.

Noen L-treoninestere (formel II) er kjente forbindelser og de resterende L-treoninestere (formel II) kan fremstilles analogt med fremstillingen av kjente forbindelser.

L-treoninestrene med formel II kan være de frie baser eller egnede organiske eller uorganiske salter derav, fortrinnsvis acetater, propionater, butyrater og hydrohalogenider så som hydroklorider.

Det er ønskelig å anvende reaktantene, dvs. insulinforbindelsen og L-treoninesteren (formel II) i høye konsentrasjoner. Det molare forhold mellom L-treoninesteren og insulinforbindelsen er fortrinnsvis over ca. 5:1.

156247

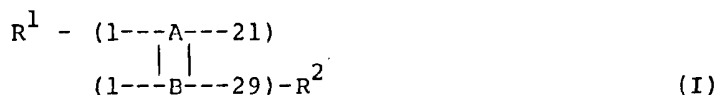
6

Det er ønskelig at konsentrasjonen av L-treonin-esteren (formel II) i reaksjonsblandingen overstiger 0,1 molar.

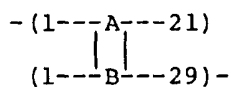
Humaninsulin kan fås fra treonin^{B30}-estere av humaninsulin (formel III) ved fjernelse av beskyttelsesgruppen R⁴ og en eventuelt tilstedeværende beskyttelsesgruppe R⁵ på kjent måte eller på i og for seg kjent måte. Hvis R⁴ er metyl, etyl eller en gruppe med formelen -CH₂CH₂SO₂R⁶, hvor R⁶ har ovennevnte betydning, kan den aktuelle beskyttelsesgruppe fjernes under milde, basiske betingelser i et vandig medium, fortrinnsvis ved en pH-verdi på mellom ca. 8 og ca. 12, f.eks. ved ca. 9,5. Som base kan anvendes ammoniakk, trietylamin eller hydroksyder av alkalimetaller så som natriumhydroksyd. Hvis R⁴ er tert.butyl, substituert benzyl så som p-metoksybenzyl eller 2,4,6-trimetylbenzyl eller difenylmetyl kan den aktuelle gruppe fjernes ved acidolyse, fortrinnsvis med trifluoreddiksyre. Trifluoreddiksyren kan være ikke-vandig eller kan inneholde noe vann, eller den kan være fortynnet med et organisk oppløsningsmiddel så som diklormetan. Hvis R⁵ er tert.butyl kan den aktuelle gruppe fjernes ved acidolyse, jfr. ovenfor.

Foretrukne treonin^{B30}-estere av humaninsulin med formel III er forbindelser hvor R⁵ er hydrogen, og disse kan fremstilles fra L-treoninestere med formel II hvor R⁵ er hydrogen.

Transpeptideringen av insulinforbindelser til treonin^{B30}-estere av humaninsulin kan beskrives mer detaljert på basis av følgende formel (I) for insulinforbindelsene:



hvor



betegner human-des(Thr^{B30})-insulindelen, hvor Gly^{A1} er forbundet med substituenten betegnet R¹ og Lys^{B29} er forbundet med substituenten betegnet R², R² betegner en aminosyre eller en peptidkjede inneholdende høyst 36 aminosyrer, og R¹ betegner

hydrogen eller en gruppe med den generelle formel R^3-X- , hvor X betegner arginin eller lysin, og R^3 betegner en peptidkjede inneholdende høyst 35 aminosyrer, eller R^2 sammen med R^3 betegner en peptidkjede inneholdende høyst 35 aminosyrer, med det forbehold at antallet av aminosyrer som er til stede i R^1 og R^2 , er mindre enn 37.

Ved transpeptideringen ifølge denne oppfinnelse omdannes en hvilken som helst av ovennevnte insulin-forbindelser således til treonin^{B30}-estere av humaninsulin (formel III), som deretter kan spaltes for dannelsen av human-insulin.

En ytterligere fordel ved denne oppfinnelse er det forhold at insulinlignende forbindelser som er til stede i rått insulin og i noen kommersielle insulinpreparater, og som er dekket av formel I, ved transpeptideringen ifølge denne oppfinnelse omdannes til treonin^{B30}-estere av humaninsulin, hvilke forbindelser derefter kan spaltes under dannelsen av humaninsulin. Eksempler på insulinlignende forbindelser med formel I fremgår av det følgende:

Svine-diarginininsulin (R^1 er hydrogen og R^2 er -Ala-Arg-Arg),
 svineproinsulin (R^3 er sammen med R^2 -Ala-Arg-Arg-Glu-Ala-Glu-Asn-Pro-Gln-Ala-Gly-Ala-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Leu-Gly-Gly-Leu-Gln-Ala-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Pro-Pro-Gln-Lys-, hvor den terminale alanyl er knyttet til Lys^{B29}),
 hundeproinsulin (R^3 er sammen med R^2 -Ala-Arg-Arg-Asp-Val-Glu-Leu-Ala-Gly-Ala-Pro-Gly-Glu-Gly-Gly-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ala-Leu-Gln-Lys-, hvor den terminale alanyl er knyttet til Lys^{B29}),
 svinesplittproinsulin (R^3 er Ala-Leu-Glu-Gly-Pro-Pro-Gln-Lys-, og R^2 er -Ala-Arg-Arg-Glu-Ala-Glu-Asn-Pro-Gln-Ala-Gly-Ala-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Leu-Gly-Gly-Leu-Gln-Ala-Leu),
 svinedesdipeptidproinsulin (R^1 er hydrogen, og R^2 er -Ala-Arg-Arg-Glu-Ala-Glu-Asn-Pro-Gln-Ala-Gly-Ala-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Leu-Gly-Gly-Leu-Gln-Ala-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Pro-Pro-Gln),
 humanproinsulin (R^3 er sammen med R^2 -Thr-Arg-Arg-Glu-Ala-Glu-Asp-Leu-Gln-Val-Gly-Gln-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-Lys-, hvor den terminale treonyl er knyttet til Lys^{B29}) og
 apeproinsulin (R^3 er sammen med R^2 -Thr-Arg-Arg-Glu-Ala-Glu-Asp-Pro-Gln-Val-Gly-Gln-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-

156247

8

Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-Lys-, hvor den terminale treonin er knyttet til Lys^{B29}).

I alle disse urenheter som er dekket av formel I, utskiftes således R¹-substituenten betegnet R³-X- med hydrogen.

En foretrukken utførelsesform for foreliggende oppfinnelse går ut på å omsette rått svineinsulin inneholdende insulinlignende forbindelser eller et salt eller kompleks derav med en L-treoninester (formel II) eller et salt derav under ovennevnte betingelser, hvorefter beskyttelsesgruppen R⁴ og en eventuelt tilstedeværende beskyttelsesgruppe R⁵ fjernes. Ved denne metode omdannes svineinsulin samt insulinlignende forbindelser deri til humaninsulin.

Som eksempler på et kompleks eller et salt av en insulinforbindelse (formel I) kan angis et sinkkompleks eller sinksalt.

Når reaksjonsbetingelsene velges i henhold til ovenstående forklaring og under hensyntagen til de resultater som er oppnådd i de følgende eksempler, er det mulig å få et utbytte av threonin^{B30}-ester av human-insulin som er over 60% og til og med over 80%, og under visse foretrukne betingelser over 90%.

Fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse har derfor følgende fordeler sammenlignet med den kjente teknikk:

- a) Den enzymatiske hydrolyse for å fjerne Ala^{B30}, f.eks. med karboksypeptidase A, er utelatt.
- b) Isolering av et mellomprodukt så som svine-des(Ala^{B30})-insulin er unødvendig.
- c) Forurensning med des(Asn^{A21})-insulinderivater unngås.
- d) Proinsulin og andre insulinlignende urenheter som er til stede i rått insulin omdannes ved fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse - via threonin^{B30}-esteren av humaninsulin - til humaninsulin, hvorved utbyttet økes.
- e) Antigene insulinlignende forbindelser, kfr. britisk patent 1.285.023 omdannes til humaninsulin.

En foretrukket fremgangsmåte for fremstilling av humaninsulin, er følgende:

1) Utgangsmaterialet som anvendes for transpeptideringen er rått svineinsulin, f.eks. krystallinsk insulin som er fremstilt under anvendelse av en citrat-buffer, jfr. US-patent 2.626.228.

2) Hvis det er trypsinaktivitet igjen etter transpeptideringen foretrekkes det å fjerne den, f.eks. under betingelser ved hvilke trypsin er inaktivt, f.eks. i surt medium ved en pH-verdi på under 3. Trypsin kan fjernes ved separering etter molekylvekt, f.eks. ved gelfiltrering på "Sephadex G-50" eller "Bio-gel P-30" i 1M eddiksyre, jfr. Nature 280, 412.

3) Andre urenheter så som uomsatt svineinsulin kan fjernes ved anvendelse av anione- og/eller kationebytter-kromatografi, jfr. eksempel 1 og 2.

4) Treonin^{B30}-esteren av human-insulin spaltes derefter og humaninsulin isoleres, f.eks. krystalliseres på i og for seg kjent måte.

På denne måte oppnås humaninsulin med en godtagbar farmasøytisk renhet, og humaninsulinet kan om ønskes renses ytterligere.

Anvendte forkortelser er i overensstemmelse med de regler som ble godkjent (1974) av IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, jfr. Collected Tentative Rules & Recommendations of the Commission on Biochemical Nomenclature IUPAC-IUB, 2nd Ed., Maryland 1975.

Analytiske undersøkelser:

Omdannelsen av svineinsulin og svineproinsulin til humaninsulinestere kan vises ved DISC-PAGE-elektroforese i 7,5% polyakrylamidgel i en buffer bestående av 0,375M TRIS, 0,06M HCl og 8M urinstoff. Bufferens pH-verdi er 8,7. Estere med formel III vandrer med en hastighet som er 75% av svineinsulinets hastighet. Svineproinsulin, som vandrer med 55% av svineinsulins hastighet, omdannes ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen til det samme produkt. Identifiseringen av omdannelsesproduktet som forbindelser med formel III er

156247

10

basert på følgende kriterier:

a) Den elektroforetiske vandring av humaninsulinestere med formel III i forhold til svineinsulin svarer til tapet av én negativ ladning.

b) Aminosyresammensetningen av de farvede proteinbånd i gelen som representerer forbindelser med formel III er identisk med humaninsulinets aminosyresammensetning, dvs. 3 mol treonin og 1 mol alanin pr. mol insulin, og sammensetningen av svineinsulin er 2 mol treonin og 2 mol alanin pr. mol insulin. Teknikken for analysering av aminosyresammensetninger av proteinbånd i polyakrylamidgeler er beskrevet i Eur. J. Biochem. 25, 147.

c) Beviset for at det innførte treonin er plassert som C-terminal aminosyre i B-kjeden kan fås ved oksydativ sulfittolyse av S-S-broene i insulin i 6M guanidinhydroklorid etterfulgt av adskillelse av A- og B-kjeder ved ionebytterkromatografi på "SP Sephadex". Ved opptagelse av B-kjede-S-sulfonatet med karboksypeptidase A frigjøres kun den C-terminale aminosyre. Teknikken er beskrevet av Markussen i Proceedings of the Symposium on Proinsulin, Insulin and C-peptide, Tokushima, 12-14 juli, 1978 (utg.: Baba, Kaneko og Yanahara) Int. Congress Series No. 468, Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford. Analysen utføres etter at estergruppen er spaltet fra forbindelser med formel III.

De 3 analyser beviser klart at det er skjedd omdannelse til humaninsulin.

Omdannelsen av svineinsulin og svineproinsulin til humaninsulinestere kan følges kvantitativt ved HPLC (høytrykksvæske-kromatografi) på omvendt fase. Det anvendes en 4 x 300 mm "µ Bondapak C₁₈-kolonne" (waters Ass.) og elueringen utføres med en buffer inneholdende 0,2M ammoniumsulfat (som er innstilt på en pH-verdi på 3,5 med svovelsyre) og inneholdende 26-50% acetonitril. Den optimale acetonitrilkonsentrasjon avhenger av hvilken ester med formel III man ønsker å skille fra svineinsulin. Hvis R⁴ er metyl og R⁵ er hydrogen oppnås separering i 26% (volum/volum) acetonitril. Svineinsulin og (Thr-OMe)^{B30}-h-In (Me er metyl) eluerer etter henholdsvis

4,5 og 5,9 kolonnevolum som klart adskilte symmetriske topper. Før påføringen på HPLC-kolonnen utfelles proteiner i reaksjonsblandingen ved tilsetning av 10 volumdeler aceton. Bunnfallet oppsamles ved sentrifugering, tørres i vakuum og oppløses i 0,02M svovelsyre.

Fremgangsmåten for fremstilling av humaninsulinestere og humaninsulin belyses nærmere ved følgende eksempler som illustrerer noen foretrukne utførelsesformer for fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen.

Eksempel 1

200 mg rått svineinsulin som er krystallisert én gang, oppløses i 1,8 ml 3,33M eddiksyre. 2 ml av en 2M oppløsning av Thr-OMe (Me er metyl) i N,N-dimetylacetamid og 20 mg trypsin oppløst i 0,2 ml vann tilsettes. Etter henstand i 18 timer ved 37°C utfelles proteinene ved tilsetning av 40 ml aceton, og bunnfallet isoleres ved sentrifugering. Den overliggende væsken kastes. Analyse av bunnfallet ved HPLC under anvendelse av 26% acetonitril (jfr. Analytiske undersøkelser) viser en 60% omdannelse av svineinsulin til (Thr-OMe)^{B30}-h-In. Bunnfallet oppløses i 8 ml friskt avionisert 8M urinstoff, pH-verdien reguleres til 8,0 med 1M ammoniakk, oppløsningen påføres på en 2,5 x 25 cm kolonne som er fylt med "QAE A-25 Sephadex" som er ekvilibrert med en 0,1M ammoniumkloridbuffer og som inneholder 60% (volum/volum)etanol, og pH-verdien derav innstilles på 8,0 med ammoniakk. Elueringen utføres med den samme buffer, og det oppsamles fraksjoner på 15 ml. (Thr-OMe)^{B30}-h-In finnes i fraksjonene nr. 26-46, uomsatt svineinsulin i fraksjonene nr. 90-120. Fraksjonene 26-46 samles, etanolen avdampes i vakuum og (Thr-OMe)^{B30}-h-In krystalliseres i citratbuffer som beskrevet av Schlichtkrull et al, Handbuch der inneren Medizin, 7/2A, 96, Berlin, Heidelberg, New York 1975. Utbyttet er 95 mg krystaller med samme rombiske form som svineinsulin som er krystallisert på analog måte. Aminosyresammensetningen viser seg å være identisk med humaninsulins aminosyresammensetning. Ytterligere analytiske undersøkelser som er beskrevet i ovenstående avsnitt: "analytiske undersøkelser" viser at det resulterende produkt er (Thr-OMe)^{B30}-h-In.

156247

12

Eksempel 2

100 mg svineinsulin som oppfyller de renhetskriterier som er angitt i britisk patent 1.285.023, oppløses i 0,9 ml 3,33M eddiksyre, og det tilsettes derefter 1 ml av en 2M oppløsning av treoninmetylester i N,N-dimetylformamid og 12 mg TPCK-behandlet (TPCK er tosylfenylalaninylmetylketon) trypsin som er oppløst i 0,1 ml vann. Etter inkubering i 24 timer ved 37°C stanses reaksjonen ved tilsetning av 4 ml 1M fosforsyre. Den erholdte (Thr-OMe)^{B30}-h-In separeres fra uomsatt svineinsulin ved ionebytterkromatografering på en 2,5 x 25 cm kolonne av "SP Sephadex" med et elueringsmiddel inneholdende 0,09M natriumklorid og 0,02M natriumdihydrogenfosfat (pH-verdi av buffer: 5,5) i 60% etanol. Fraksjoner inneholdende (Thr-OMe)^{B30}-h-In oppsamles, etanolen fjernes i vakuum og produktet krystalliseres på analog måte som beskrevet i eksempel 1. Utbyttet er 50 mg (Thr-OMe)^{B30}-h-In.

Eksempel 3

100 mg svineproinsulin oppløses i 0,9 ml 3,33M eddiksyre og omdannes til (Thr-OMe)^{B30}-h-In og renses på analog måte som beskrevet for svineinsulin i eksempel 1. Omdannelsen av proinsulin til (Thr-OMe)^{B30}-h-In viser seg å være 73% ved HPLC-analyse av aceton-bunnfallet. Utbyttet av krystallinsk (Thr-OMe)^{B30}-h-In er 54 mg.

Eksempel 4

100 mg svineinsulin oppløses i 0,9 ml 2,77M eddiksyre i vann og omsettes på analog måte som beskrevet i eksempel 2. Etter avslutning av omsetningen utfelles proteinene ved tilsetning av 10 volumdeler aceton. Analyse ved DISC PAGE viser en omdannelse til (Thr-OMe)^{B30}-h-In på 70%.

Eksempel 5

100 mg svineinsulin oppløses i 0,9 ml 3,33M eddiksyre og 1 ml 2M Thr-OMe i N-metylpyrrolidon tilsettes. Omsetningen utføres analogt med eksempel 4, og omdannelsen til (Thr-OMe)^{B30}-h-In er 20%.

Eksempel 6

100 mg svineinsulin oppløses i 0,9 ml 2,77M eddiksyre i vann og 1 ml 2M Thr-OMe i HMPA (heksametylfosfortriamid) tilsettes. Omsetningen utføres på analog måte som beskrevet i eksempel 4. Omdannelsen til (Thr-OMe)^{B30}-h-In er 80%.

Eksempel 7

100 mg svineinsulin oppløses i 0,9 ml 3,33M eddiksyre og 1 ml 2M Thr-OMe i N,N-dimetylacetamid tilsettes. Omsetningen utføres på analog måte som beskrevet i eksempel 4. Omdannelsen til (Thr-OMe)^{B30}-h-In er 80%.

Eksempel 8

100 mg svineinsulin oppløses i 0,9 ml 3,33M eddiksyre og 1 ml 2M Thr-OMe i N,N-dimetylacetamid tilsettes. Derefter tilsettes 200 U (units = enheter) trypsinaktivitet (bestemt med substratet BAEE) immobilisert på 1 g glassperler, og etter inkubering ved 37°C i 24 timer frafiltreres trypsinet bundet til glasset. Etter avslutning av omsetningen utfelles proteinene ved tilsetning av 10 volumdeler aceton. Analyse ved DISC PAGE viser en omdannelse til (Thr-OMe)^{B30}-h-In på 40%.

Eksempel 9

100 mg svineinsulin oppløses i 0,9 ml 3,33M eddiksyre og 1 ml 2M Thr-OMe i N,N-dimetylacetamid tilsettes. Derefter tilsettes 300U trypsin aktivitet (målt med substratet BAEE) som er immobilisert på 200 µg CNBr-aktivert "Sephadex G-150". Etter inkubering ved 37°C i 24 timer frafiltreres trypsinet bundet til "Sephadex". Etter avslutning av omsetningen utfelles proteinene ved tilsetning av 10 volumdeler aceton. Analyse ved DISC PAGE viser en omdannelse til (Thr-OMe)^{B30}-h-In på 70%.

Eksempel 10

Den i eksempel 7 angitte fremgangsmåte gjentas med det forbehold at den anvendte ester er 2M Thr-OBu^t (Bu^t er tert.-butyl) i N,N-dimetylacetamid. Omdannelsen til (Thr-OBu^t)^{B30}-h-In er 80%.

156247

14

Eksempel 11

Den i eksempel 8 angitte fremgangsmåte gjentas med det forbehold at den anvendte ester er 2M Thr-OBu^t i N,N-dimetylacetamid. Omdannelsen til (Thr-OBu^t)^{B30}-h-In er 30%.

Eksempel 12

Den i eksempel 9 angitte fremgangsmåte gjentas med det forbehold at den anvendte ester er 2M Thr-OBu^t i N,N-dimetylacetamid. Omdannelsen til (Thr-OBu^t)^{B30}-h-In er 70%.

Eksempel 13

100 mg svineproinsulin oppløses i 0,9 ml 3,33M eddiksyre og 1 ml 2M Thr-OMe i N,N-dimetylacetamid tilsettes. Omsetningen utføres på analog måte som beskrevet i eksempel 4. Omdannelsen til (Thr-OMe)^{B30}-h-In er 80%.

Eksempel 14

100 mg svineproinsulin oppløses i 0,9 ml 3,33M eddiksyre og 1 ml 2M Thr-OMe i N,N-dimetylacetamid tilsettes. Blandingen behandles med immobilisert trypsin på analog måte som beskrevet i eksempel 8. Omdannelsen til (Thr-OMe)^{B30}-h-In er 40%.

Eksempel 15

100 mg svineproinsulin oppløses i 0,9 ml 3,33M eddiksyre og 1 ml 2M Thr-OMe i N,N-dimetylacetamid tilsettes. Blandingen behandles med immobilisert trypsin på analog måte som beskrevet i eksempel 9. Omdannelsen til (Thr-OMe)^{B30}-h-In er 70%.

Eksempel 16

100 mg svineproinsulin oppløses i 0,9 ml 3,33M eddiksyre og 1 ml 2M Thr-OBu^t i N,N-dimetylacetamid tilsettes. Omsetningen utføres på analog måte som beskrevet i eksempel 4. Omdannelsen til (Thr-OBu^t)^{B30}-h-In er 80%.

Eksempel 17

100 mg svineproinsulin oppløses i 0,9 ml 3,33M eddiksyre og 1 ml 2M Thr-OBu^t i N,N-dimetylacetamid tilsettes. Blandingen behandles med trypsin som er immobilisert på plassperler, på analog måte som beskrevet i eksempel 8. Omdannelsen til

(Thr-OBu^t)^{B30}-h-In er 40%.

Eksempel 18

100 mg svineproinsulin oppløses i 0,9 ml 3,33M eddiksyre og 1 ml 2M Thr-OBu^t i N,N-dimetylacetamid tilsettes. Blandingen behandles med trypsin som er immobilisert til CNBr-aktivert "Sephadex G-150" på analog måte som beskrevet i eksempel 9. Omdannelsen til (Thr-OBu^t)^{B30}-h-In er 70%.

Eksempel 19

100 mg svineinsulin oppløses i 0,5 ml 6M eddiksyre og 1 ml 1M Thr-OTmb (Tmb er 2,4,6-trimetylbenzyl) i N,N-dimetylacetamid tilsettes. Det tilsettes ytterligere 0,5 ml N,N-dimetylacetamid og 5 mg TPCK-behandlet trypsin i 0,1 ml vann. Reaksjonsblandingen oppbevares ved 32°C i 44 timer. Etter avslutning av omsetningen utfelles proteinene ved tilsetning av 10 volumdeler aceton. Analyse ved DISC PAGE viser en omdannelse til (Thr-OTmb)^{B30}-h-In på 50%.

Eksempel 20

100 mg svineinsulin oppløses i 0,9 ml 3M eddiksyre og 1 ml 2M Thr-OME i dioksan tilsettes. Omsetningen utføres på analog måte som beskrevet i eksempel 4, og omdannelsen til (Thr-OME)^{B30}-h-In er 10%.

Eksempel 21

100 mg svineinsulin oppløses i 0,9 ml 3M eddiksyre og 1 ml 2M Thr-OME i acetonitril tilsettes. Omsetningen utføres på analog måte som beskrevet i eksempel 4, og omdannelsen til (Thr-OME)^{B30}-h-In er 10%.

Eksempel 22

250 mg krystallinsk (Thr-OME)^{B30}-h-In dispergeres i 25 ml vann og oppløses ved tilsetning av 1N natriumhydroksydoppløsning til en pH-verdi på 10,0. pH-verdien holdes konstant ved 10,0 i 24 timer ved 25°C. Det dannede humaninsulin krystalliseres ved tilsetning av 2 g natriumklorid, 350 mg natriumacetattrihydrat og 2,5 mg sinkacetatdihydrat etterfulgt av tilsetning av 1N salt-syre for å oppnå en pH-verdi på 5,52. De romboedriske krystaller

156247

16

isoleres ved sentrifugering etter oppbevaring i 24 timer ved 4°C, vaskes med 3 ml vann, isoleres ved sentrifugering og tørres i vakuum. Utbytte: 220 mg human-insulin.

Eksempel 23

100 mg (Thr-OTmb)^{B30}-h-In oppløses i 1 ml iskald trifluor-eddiksyre og oppløsningen oppbevares i 2 timer ved 0°C. Det dannede humaninsulin utfelles ved tilsetning av 10 ml tetrahydrofuran og 0,97 ml 1,03M saltsyre i tetrahydrofuran. Det dannede bunnfall isoleres ved sentrifugering, vaskes med 10 ml tetrahydrofuran, isoleres ved sentrifugering og tørres i vakuum. Bunnfallet oppløses i 10 ml vann, og oppløsningens pH-verdi innstilles på 2,5 med 1N natriumhydroksydoppløsning. Human-insulinet utfelles ved tilsetning av 1,5 g natriumklorid og isoleres ved sentrifugering. Bunnfallet oppløses i 10 ml vann, og human-insulinet utfelles ved tilsetning av 0,8 g natriumklorid, 3,7 mg sinkacetatdihydrat og 0,14 g natriumacetat-trihydrat etterfulgt av tilsetning av 1N natriumhydroksydoppløsning for å oppnå en pH-verdi på 5,52. Bunnfallet isoleres ved sentrifugering etter henstand i 24 timer ved 4°C, vaskes med 0,9 ml vann, isoleres ved sentrifugering og tørres i vakuum. Utbytte: 90 mg humaninsulin.

Eksempel 24

100 mg svineinsulin oppløses i 0,5 ml 10M eddiksyre og 1,3 ml 1,54M Thr-OMe i N,N-dimetylacetamid tilsettes. Blandingen avkjøles til 12°C. 10 mg trypsin oppløst i 0,2 ml 0,04M kalsiumacetat tilsettes. Etter 48 timer ved 12°C utfelles proteinene ved tilsetning av 20 ml aceton. Omdannelsen av svineinsulin til (Thr-OMe)^{B30}-h-In er 97% ved HPLC.

Eksempel 25

20 mg svineinsulin oppløses i en blanding av 0,08 ml 10M eddiksyre og 0,14 ml vann. 0,2 ml 2M Thr-OMe i N,N-dimetylacetamid tilsettes, og blandingen avkjøles til -10°C. Det tilsettes 2 mg trypsin oppløst i 0,025 ml 0,05M kalsiumacetat. Etter 72 timer ved -10°C utfelles proteinene ved tilsetning av 5 ml aceton. Omdannelsen av svineinsulin til (Thr-OMe)^{B30}-h-In er 64% ved HPLC.

Eksempel 26

20 mg svineinsulin dispergeres i 0,1 ml vann. Ved tilsetning av 0,6 ml 2M Thr-OMe i N,N-dimetylacetamid går insulinet i oppløsning. Blandingen avkjøles til 7°C. 2 mg trypsin oppløst i 0,025 ml 0,05M kalsiumacetat tilsettes. Etter 24 timer ved 7°C utfelles proteinene ved tilsetning av 5 ml aceton. Omdannelsen av svineinsulin til (Thr-OMe)^{B30}-h-In er 62% ved HPLC.

Eksempel 27

20 mg svineinsulin oppløses i 0,135 ml 4,45M propionsyre. 0,24 ml 1,67M Thr-OMe i N,N-dimetylacetamid tilsettes. Det tilsettes 2 mg trypsin i 0,025 ml 0,05M kalsiumacetat, og blandingen oppbevares ved 37°C i 24 timer. Proteinene utfelles ved tilsetning av 10 volumdeler 2-propanol. Omdannelsen av svineinsulin til (Thr-OMe)^{B30}-h-In er 75% ved HPLC.

Eksempel 28

20 mg svineinsulin dispergeres i 0,1 ml vann. Det tilsettes 0,4 ml 2M Thr-OMe i N,N-dimetylacetamid etterfulgt av 0,04 ml 10N saltsyre, hvorved insulinet går i oppløsning. Det tilsettes 2 ml trypsin oppløst i 0,025 ml 0,05M kalsiumacetat, og blandingen oppbevares ved 37°C i 4 timer. HPLC-analyse viser en 46%'s omdannelse av svineinsulin til (Thr-OMe)^{B30}-h-In.

Eksempel 29

20 mg svineinsulin oppløses i 0,175 ml 0,57M eddiksyre. Det tilsettes 0,2 ml 2M Thr-OMe i N,N-dimetylacetamid etterfulgt av tilsetning av 0,025 ml 0,05M kalsiumacetat. Det tilsettes 10 mg av et rått preparat av *Achromobacter lyticus*-protease, og blandingen oppbevares i 22 timer ved 37°C. Proteinene utfelles ved tilsetning av 10 volumdeler aceton. Omdannelsen av svineinsulin til (Thr-OMe)^{B30}-h-In er 12% ved HPLC.

156247

18

Eksempel 30

20 mg svineinsulin dispergeres i 0,1 ml 0,5M eddiksyre. Ved tilsetning av 0,2 ml 0,1M Thr-OMe i N,N-dimetylacetamid oppløses insulinet. Blandingen avkjøles til 12°C og det tilsettes 2 mg trypsin i 0,025 ml 0,05M kalsiumacetat. Etter 24 timer ved 12°C viser HPLC-analysen en 42% omdannelse av svineinsulin til (Thr-OMe)^{B30}-h-In.

Eksempel 31

2 mg kanininsulin oppløses i 0,135 ml 4,45M eddiksyre. Det tilsettes 0,24 ml 1,67M Thr-OMe i N,N-dimetylacetamid etterfulgt av tilsetning av 1,25 mg trypsin i 0,025 ml 0,05M kalsiumacetat. Blandingen oppbevares ved 37°C i 4 timer. Analyse ved HPLC viser en 88% omdannelse av kanininsulin til (Thr-OMe)^{B30}-h-In. Kanininsulin eluerer før svineinsulin fra HPLC-kolonnen, idet forholdet mellom elueringsvolumet for kanininsulin og (Thr-OMe)^{B30}-h-In er 0,72.

Eksempel 32

2 mg svinediarginininsulin (Arg^{B31}-Arg^{B32}-insulin) oppløses i 0,135 ml 4,45M eddiksyre. Det tilsettes 0,24 ml 1,67M Thr-OMe i N,N-dimetylacetamid etterfulgt av tilsetning av 1,25 mg trypsin i 0,025 ml 0,05M kalsiumacetat. Blandingen oppbevares ved 37°C i 4 timer. HPLC-analyse viser en 91% omdannelse av diarginininsulin til (Thr-OMe)^{B30}-h-In. Diarginininsulin eluerer før svineinsulin fra HPLC-kolonnen, idet forholdet mellom elueringsvolumet for diarginininsulin og (Thr-OMe)^{B30}-h-In er 0,50.

Eksempel 33

2 mg "svinemellomprodukter" (dvs. blanding av desdipeptid-(Lys⁶²-Arg⁶³)proinsulin og desdipeptid-(Arg³¹-Arg³²)proinsulin) omsettes på analog måte som beskrevet i eksempel 32. HPLC-analyse viser 88% (Thr-OMe)^{B30}-h-In.

Eksempel 34

20 mg svineinsulin oppløses i 0,1 ml 2M eddiksyre. Det tilsettes 0,2 ml 2M Thr-OMe i N,N-dimetylacetamid, og blandingen avkjøles til -18°C . Det tilsettes 2 mg trypsin oppløst i 0,025 ml 0,05M kalsiumacetat, og blandingen oppbevares i 120 timer ved -18°C . HPLC-analyse viser at omdannelsen til (Thr-OMe)^{B30}-h-In er 83%.

Eksempel 35

Den i eksempel 34 angitte fremgangsmåte gjentas med det forbehold at omsetningen utføres ved 50°C i 4 timer. HPLC-analyse viser at omdannelsen til (Thr-OMe)^{B30}-h-In er 23%.

Eksempel 36

20 mg svineinsulin oppløses i 0,1 ml 3M eddiksyre. Det tilsettes 0,3 ml 0,33M Thr-O(CH₂)₂-SO₂-CH₃.CH₃COOH (treonin-2-(metylsulfonyl)etylesterhydroacetat) i N,N-dimetylacetamid. Blanding avkjøles til 12°C og det tilsettes 2 mg trypsin i 0,025 ml 0,05M kalsiumacetat. HPLC viser etter 24 timer ved 12°C en 77% omdannelse til (Thr-O(CH₂)₂-SO₂-CH₃)^{B30}-h-In. Produktet eluerer omtrentlig ved posisjonen for (Thr-OMe)^{B30}-h-In.

Eksempel 37

20 mg svineinsulin oppløses i 0,1 ml 10M eddiksyre. Det tilsettes 0,2 ml 2M Thr-OEt (Et er etyl) i N,N-dimetylacetamid, og blandingen avkjøles til 12°C . Det tilsettes 2 mg trypsin i 0,025 ml 0,05M kalsiumacetat. HPLC viser etter 24 timer ved 12°C en 75% omdannelse til (Thr-OEt)^{B30}-h-In. Produktet eluerer i en posisjon like etter (Thr-OMe)^{B30}-h-In.

Eksempel 38

20 mg svineinsulin oppløses i 0,1 ml 6M eddiksyre. Det tilsettes 0,3 ml 0,67M Thr(Bu^t)-OBu^t i N,N-dimetylacetamid. Blanding avkjøles til 12°C og det tilsettes 2 mg trypsin i 0,025 ml 0,05M kalsiumacetat. Etter 24 timer ved 12°C er omdannelsen til (Thr(Bu^t)-OBu^t)^{B30}-h-In 77%. Produktet elueres fra HPLC-kolonnen under anvendelse av en gradient i acetonitril fra 27% til 40%.

156247

20

Eksempel 39

20 mg svineinsulin oppløses i 0,1 ml 4M eddiksyre. Det tilsettes 0,2 ml 1,5M Thr-OMe oppløst i tetrahydrofuran, og blandingen avkjøles til 12°C. Det tilsettes 2 mg trypsin oppløst i 0,025 ml 0,05M kalsiumacetat. Etter 4 timer ved 12°C viser HPLC-analyse en omdannelse til (Thr-OMe)^{B30}-h-In på 75%.

Eksempel 40

20 mg svineinsulin oppløses i 0,1 ml 4M eddiksyre. Det tilsettes 0,8 ml 2M Thr-OMe oppløst i 1,2-etandiol, og blandingen avkjøles til 12°C. Det tilsettes 2 mg trypsin oppløst i 0,025 ml 0,05M kalsiumacetat. Etter 4 timer ved 12°C viser HPLC-analyse en omdannelse til (Thr-OMe)^{B30}-h-In på 48%.

Eksempel 41

20 mg svineinsulin oppløses i 0,1 ml 4M eddiksyre. Det tilsettes 0,2 ml 2M Thr-OMe oppløst i etanol, og blandingen avkjøles til 12°C. Det tilsettes 2 mg trypsin oppløst i 0,025 ml 0,05M kalsiumacetat, og omsetningen utføres i 4 timer ved 12°C. HPLC-analyse viser en 46% omdannelse til (Thr-OMe)^{B30}-h-In.

Eksempel 42

20 mg svineinsulin oppløses i 0,1 ml 4M eddiksyre. Det tilsettes 0,2 ml 2M Thr-OMe i aceton, og blandingen avkjøles til 12°C. Det tilsettes 2 mg trypsin oppløst i 0,025 ml 0,05M kalsiumacetat. Etter 4 timer ved 12°C viser HPLC-analyse en omdannelse til (Thr-OMe)^{B30}-h-In på 48%.

Beregning av vanninnholdBeregning av vanninnhold for eksempel 4

Interpolering fra tabell 1, side D-220, i Handbook of Chemistry and Physics 58 (1977/78), gir at 2,77 M eddiksyre inneholder 854 gram vann pr. liter. 0,9 ml 2,77 M eddiksyre inneholder således $854 \times 0,9 / 1000 = 0,769$ ml vann.

Det totale vanninnhold i den endelige reaksjonsblanding er $0,769 + 0,1 = 0,869$ ml. Reaksjonsblandingens totale volum er $0,9 + 1 + 0,1 = 2$ ml. Således inneholder reaksjonsblandingens $0,869 \times 100 / 2 = 43$ % (volum/volum) vann.

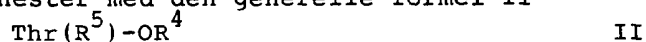
Beregning av vanninnhold for eksempel 19

Interpolering fra tabell 1, ovenfor, gir at 6 M eddiksyre inneholder 682 gram vann pr. liter. 0,5 ml 6 M eddiksyre inneholder således $682 \times 0,5 / 1000 = 0,341$ ml vann.

Det totale vanninnhold i den endelige reaksjonsblanding er $0,341 + 0,1 = 0,441$ ml. Reaksjonsblandingens totale volum er $0,5 + 1 + 0,5 + 0,1 = 2,1$ ml. Således inneholder reaksjonsblandingens $0,441 \times 100 / 2,1 = 21$ % (volum/volum) vann.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for fremstilling av humaninsulin eller treonin^{B30}-estere av humaninsulin eller et salt eller kompleks derav fra en L-treoninester med den generelle formel II



hvor R^4 betegner en karboksyl-beskyttelsesgruppe og R^5 betegner hydrogen eller en hydroksyl-beskyttelsesgruppe, og en insulinforbindelse som inneholder de i humaninsulin foreliggende aminosyresekvenser A1-A21 og B1-B29, i nærvær av en protease, k a r a k t e r i s e r t v e d at insulinforbindelsen eller et salt eller kompleks derav, som kan omdannes dertil, omsettes med L-treonin-esteren eller et salt derav i en blanding av vann og et vannblandbart, organisk oppløsningsmiddel, idet vanninnholdet i reaksjonsblandingen er under 50% (volum/volum) i nærvær av trypsin, modifisert trypsin eller Achromobacter lyticus-protease, ved en reaksjonstemperatur mellom 50°C og reaksjonsblandingsens størkningspunkt, hvorefter den resulterende treonin^{B30}-ester av humaninsulin om ønsket spaltes.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at konsentrasjonen av L-treoninester i reaksjonsblandingen overstiger 0,1 molar, og at reaksjonsblandingen inneholder fra 0 til 10 ekvivalenter av en syre pr. ekvivalent L-treoninester.

3. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, k a r a k t e r i s e r t v e d at insulinforbindelsen er av svine-opprinnelse.

4. Fremgangsmåte ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at det som insulinforbindelse anvendes relativt rått insulin.

5. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, k a r a k t e r i s e r t v e d at reaksjonstemperaturen er under 37°C, fortrinnsvis under romtemperatur, og over 0°C.

6. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, k a r a k t e r i s e r t v e d at innholdet av vann i reaksjonsblandingen er mellom 43 og 10% (volum/volum).

7. Fremgangsmåte ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at innholdet av vann i reaksjonsblandingen er mellom 43 og 21% (volum/volum).

8. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-5, k a r a k t e r i s e r t v e d at insulinforbindelsen er svineinsulin, at L-treoninesteren er Thr-OMe eller Thr-OBu^t, at det vannblandbare, organiske oppløsningsmiddel er N,N-dimetylformamid eller N,N-dimetylacetamid, at reaksjonstemperaturen er ca. 37°C, at innholdet av vann i reaksjonsblandingen er mellom 41 og 43%, at vektforholdet mellom trypsin og insulinforbindelsen er ca. 1:8, at molforholdet mellom L-treoninesteren og insulinforbindelsen er ca. 120:1 og at det er tilsatt mellom 1,2 og 1,5 ekvivalenter eddiksyre pr. ekvivalent L-treoninester.