

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
12. Februar 2004 (12.02.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/013176 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 14/62

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/007820

(22) Internationales Anmeldedatum:
18. Juli 2003 (18.07.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 35 168.6 1. August 2002 (01.08.2002) DE

(71) Anmelder: AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND
GMBH [DE/DE]; Brüningstrasse 50, 65929 Frankfurt
(DE).

(72) Erfinder: THUROW, Horst; Buchenstrasse 3, 65582
Hambach (DE). BLUMENSTOCK, Hans; Flörsheimer-
str. 33, 65795 Hattersheim (DE). HAVENITH, Chantalle;
Adolph-Kolping-Str. 5, 65719 Hofheim (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.



WO 2004/013176 A1

(54) Title: METHOD FOR PURIFYING PREPROINSULIN

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR REINIGUNG VON PREPROINSULIN

(57) Abstract: The invention relates to a method for the chromatographic purification of preproinsulins, according to which higher-molecular substances are separated from an aqueous solution of the preproinsulin by means of a first chromatography on an anion exchanger in through-flow mode and a subsequent second chromatography on a cation exchanger in adsorption mode, and a method for the production of insulins, which comprises the method for producing preproinsulins.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur chromatographischen Reinigung von Preproinsulinen bei dem höhermolekulare Substanzen aus einer wässrigen Lösung des Preproinsulins durch eine erste Chromatographie an einem Anionenaustauscher im Durchflussmodus und eine anschließende zweite Chromatographie an einem Kationenaustauscher im Adsorptionsmodus abgetrennt werden, sowie auf ein Verfahren zur Herstellung von Insulinen, welches das Verfahren zur Herstellung von Preproinsulinen miteinschliesst.

Beschreibung

Verfahren zur Reinigung von Preproinsulin

Weltweit leiden etwa 12 Mio. Menschen an dem Typ 1 des Diabetes mellitus, der
5 durch eine unzureichende körpereigene Produktion des Hormons Insulin
gekennzeichnet ist. Für diesen Typus des Diabetes mellitus stellt die Substitution der
fehlenden endokrinen Insulinsekretion durch Applikation von Insulinpräparaten die
einzig mögliche Therapieform dar.

10 Insulinpräparate sind pharmazeutische Zubereitungen, die als Wirkstoff das Hormon
Insulin enthalten. Dabei werden nicht nur natürlich vorkommende Insuline verwendet,
sondern auch Insulinanaloga und Insulinderivate.

Das in der menschlichen Bauchspeicheldrüse produzierte Humaninsulin ist ein
15 Polypeptid bestehend aus 51 Aminosäureresten, die sich auf 2 Peptidketten verteilen:
die A-Kette mit 21 Aminosäureresten und die B-Kette mit 30 Aminosäureresten. In
beiden Peptidketten ist die Sequenz der Aminosäurereste genetisch determiniert und
bekannt. Beide Ketten sind durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden.
Daneben befindet sich in der A-Kette noch eine intrachainare Disulfidbrücke.

20

Insulinanaloga unterscheiden sich vom Humaninsulin durch Substitution wenigstens
eines Aminosäurerestes und/oder Addition oder Entfernen wenigstens eines
Aminosäurerestes. Insulinanaloga können entweder in anderen Spezies als dem
Menschen natürlich vorkommen oder sie können künstlich hergestellt worden sein.
25 Insulinderivate enthalten chemisch modifizierte Aminosäurereste, die z.B. zusätzliche
Ester- oder Amidogruppen enthalten, ansonsten aber die humane oder eine analoge
Aminosäuresequenz zeigen.

In der Regel zeigen Insulinanaloga bzw. Insulinderivate gegenüber dem
30 unmodifizierten Humaninsulin eine veränderte Wirkungskinetik.

2.

Seit einigen Jahren werden das Humaninsulin und die Insulinanaloga bzw. Insulinderivate durch die rekombinante DNA Technologie hergestellt. In industriellen Verfahren wird zum Beispiel zuerst ein entsprechender precursor der Formel 1, das Preproinsulin (PPI) hergestellt, aus dem durch enzymatische Spaltung das

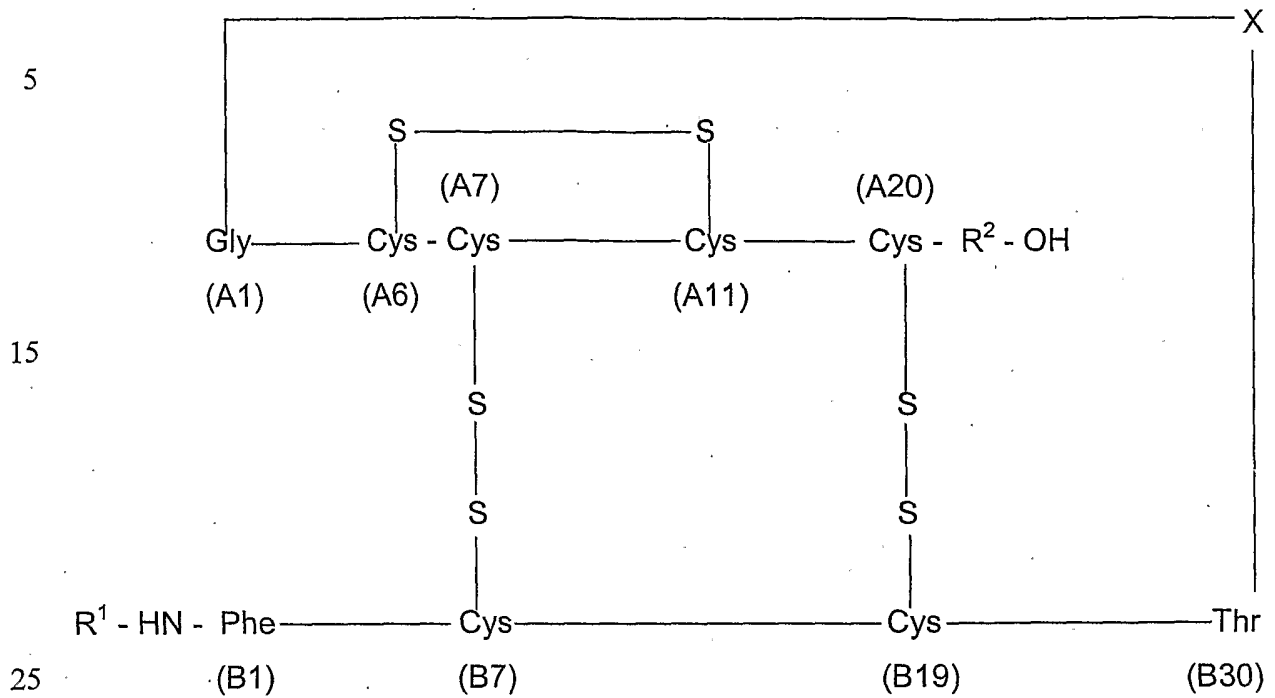
5 Humaninsulin oder die Insulinanaloga hergestellt werden. Zum Beispiel besteht ein gentechnologisches Verfahren zur Herstellung von Humaninsulin aus folgenden Verfahrensschritten:

- a) Fermentation der gentechnisch veränderten Mikroorganismen
- 10 b) Ernten der Mikroorganismen und Zellaufschluß
- c) Isolierung der Einschlusskörper mit dem ungelösten Fusionsprotein
- d) Auflösen des Fusionproteins mit korrekter Faltung der Peptidkette und mit gleichzeitiger Schließung der Disulfidbrücken zum Preproinsulin
- e) Enzymatische Spaltung des Preproinsulins zum Humaninsulin
- 15 f) Reinigung des Humaninsulins
- g) Kristallisation des Humaninsulins und Trocknung des Abgabeprodukts

Bei der Herstellung eines Insulinanalogons ist die Aminosäuresequenz (der A- und B-Kette) in den entsprechenden Bereichen des Preproinsulins bereits vorgegeben. Für

20 die enzymatische Spaltung der verschiedenen Preproinsuline werden Proteasen, wie zum Beispiel das Enzym Trypsin und falls notwendig zusätzlich das Enzym Carboxypeptidase B verwendet.

25 Das Preproinsulin ist ein Protein der Formel 1,



30

in der

X

- a) ein genetisch kodierbarer Aminosäurerest oder
- b) ein Peptid mit 2 bis 35 Aminosäureresten, wobei am Anfang und am Ende des Peptids jeweils ein basischer Aminosäurerest, insbesondere Arg steht, und für den Fall, dass das Peptid aus mehr als 3 Aminosäureresten besteht, am Anfang und Ende des Peptids jeweils zwei basische Aminosäurereste, insbesondere Arg und/oder Lys stehen,

35

40 R¹

- a) ein Wasserstoffatom,
- b) ein genetisch kodierbarer Aminosäurerest oder
- c) ein Peptid mit 2 bis 15 Aminosäureresten,

R² ein genetisch kodierbarer Aminosäurerest ist und

und die Reste A1 – A20 der Aminosäuresequenz der A-Kette von Humaninsulin oder einem Insulinanalogon entsprechen und die Reste B1 – B30 der Aminosäuresequenz
5 der B-Kette von Humaninsulin oder einem Insulinanalogon entsprechen.

Das Preproinsulin ist bevorzugt ein Protein der Formel 1, in der

X ein Peptid mit 35 Aminosäureresten mit der Sequenz der C-Kette von
10 Humaninsulin oder Affeninsulin, oder ein Peptid mit 29 Aminosäuren mit
der Sequenz:

Arg-Asp-Val-Pro-Gln-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-
Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-Lys-Arg (SEQ ID NO: 1)

15

R¹ ein Peptid mit 2 bis 15 Aminosäureresten, an dessen Carboxylende der
Aminosäurerest Arg steht,

R² der Aminosäurerest Asn oder Gly steht,

20

und die Reste A1 – A20 der Aminosäuresequenz der A-Kette von Humaninsulin
entsprechen und die Reste B1 – B30 der Aminosäuresequenz der B-Kette von
Humaninsulin oder einem Insulinanalogon entsprechen, bei dem in der B3-Position
Lys anstatt Asn und in der B29-Position Glu anstatt Lys stehen.

25

In der Prozessstufe – Auflösen des Fusionsproteins mit korrekter Faltung der
Peptidkette und mit gleichzeitiger Schließung der Disulfidbrücken zum Preproinsulin –
entstehen neben dem erwünschten monomeren Preproinsulin in einer
Konkurrenzreaktion auch polymere Formen des Preproinsulins. Diese polymeren
30 Preproinsuline lassen sich aufgrund ihres höheren Molekulargewichtes durch die
HPLC-GPC-Analyse oder durch die Methode der dynamischen Lichtstreuung
nachweisen. Um diese unerwünschte Konkurrenzreaktion zurückzudrängen muss die

Anfangskonzentration des Fusionsproteins möglichst gering sein (De Bernadez et al., Meth. Enzym. 309:217, 1999). In der Praxis entsteht in dieser Prozessstufe das Preproinsulin in einer Konzentration von ca. 0,5 bis 1 g/L und zusätzlich findet man ca. 40 % höhermolekulare Anteile. Unter den höhermolekularen Anteilen befinden sich die
5 polymeren Preproinsuline.

Es wurde im Rahmen dieser Erfindung überraschenderweise gefunden, dass die polymeren Formen der Preproinsuline die Stabilität der Insuline auf den nachfolgenden Prozessstufen negativ beeinflussen, indem sie die Denaturierung der nativen Insuline induzieren. Es ist bekannt, dass während der Reaktionskette der Denaturierung in
10 einem ersten reversiblen Schritt aus den gelösten monomeren Insulinmolekülen lineare Aggregate entstehen, in denen die Wiederholungseinheiten durch physikalische Adhäsionskräfte zusammengehalten werden. In einer irreversiblen Folgereaktion entstehen aus den gelösten Aggregaten stabile unlösliche
15 Aggregatbündel (Fibrillen), die ihrerseits in einem autokatalytischen Prozess die Denaturierung nativer Insuline induzieren. Diese unlöslichen Insulinfibrillen sind nicht nur biologisch inaktiv, sondern sie können auch zum Verstopfen von Injektionskanülen bei der Applikation der pharmazeutischen Insulinpräparate führen. Daneben werden sie auch für immunologische Unverträglichkeitsreaktionen verantwortlich gemacht, die gelegentlich während der Therapie mit Insulinpräparaten auftreten können (J.Bränge
20 et al, J. Pharm. Sc. 1997, 86, 517-525; R.E. Ratner et al., Diabetes, 39, 728-733, 1990).

In der weiteren Folge des Insulin-Herstellungsprozesses wird das Preproinsulin mit Hilfe der Enzyme Trypsin und Carboxypeptidase B in Humaninsulin umgewandelt
25 (siehe Kemmler, W., Peterson, J.D., and Steiner, D.F., J. Biol. Chem., 246 (1971) 6786-6791). Dabei werden das Verbindungspeptid zwischen der A- und B-Kette (X in der Formel 1) und der Preteil am Aminoende der B-Kette (R¹ in der Formel 1) abgespalten. Bei der enzymatischen Reaktion mit Trypsin werden nicht nur diejenigen Peptidbindungen gespalten, deren Spaltung zum Humaninsulin führt, sondern in einer
30 konkurrierenden Reaktion auch andere Peptidbindungen, deren Spaltung zu mehreren unerwünschten Nebenprodukten führt. Besonders unerwünscht ist die Bildung von des-Thr-Insulin durch zusätzliche Spaltung zwischen den Aminosäureresten B29 und

B30 in Formel 1 (siehe EP 0 264 250 B1). Die Abtrennung dieses Nebenproduktes in den nachfolgenden Reinigungsstufen führt zu großen Produktverlusten. Um diese unerwünschte Nebenreaktion zurückzudrängen, muss die Anfangskonzentration an Preproinsulin möglichst hoch sein, d.h. im Bereich von 8 – 25 g/L, entsprechend 1 – 3
5 mM (siehe EP 0 264 250 B1). Diese Forderung steht im Gegensatz zu der im vorvorgehenden Absatz erwähnten Forderung.

Aus dem oben gesagten geht hervor, daß es von Vorteil ist, zwischen der Herstellung des Preproinsulins und der Spaltung des Preproinsulins zum Insulin einen zusätzlichen Prozessschritt einzuführen, der die polymeren Preproinsuline möglichst vollständig
10 entfernt und gleichzeitig die Konzentration des monomeren Preproinsulins möglichst stark erhöht. Dass bei diesem Prozessschritt eine möglichst hohe Stufenausbeute gewährleistet sein muss, ist eine zusätzliche Bedingung.

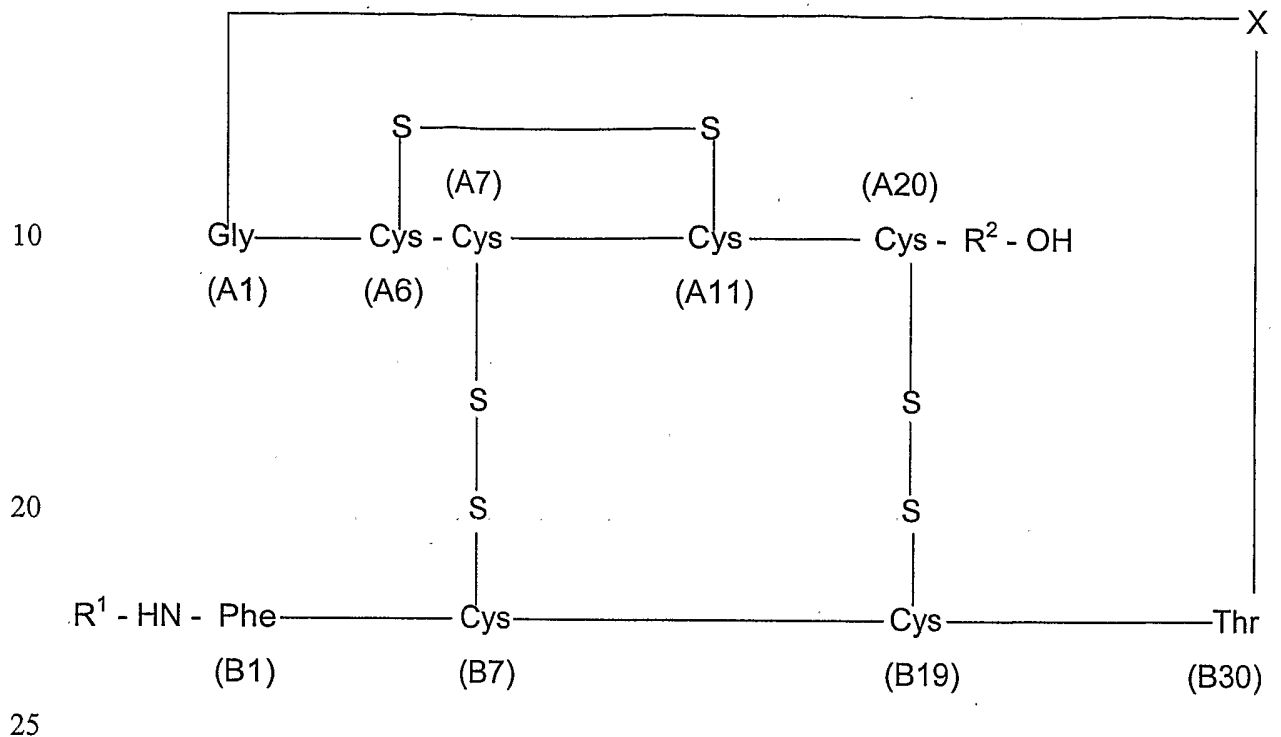
Es wurde deshalb vorgeschlagen (EP 0 600 372 B1), das Preproinsulin an ein
15 hydrophobes Adsorberharz zu konzentrieren. Der Antragsteller konnte mit eigenen Versuchen zeigen, dass dabei zwar ein hoher Konzentrierungsfaktor von $F = 10 - 15$ erreicht werden kann, aber praktisch keine Abtrennung der polymeren Preproinsuline erfolgt. Ein weiterer Vorschlag (D.F. Steiner et al., Diabetes, 17 (1968), 725-736) erwähnt die chromatographische Reinigung des Preproinsulins mit Hilfe eines
20 Ionenaustauscherharzes. In eigenen Versuchen konnte mit einem Anionenaustauscherharz nur ein Konzentrierungsfaktor von $F = 5$ und eine Abtrennung der höhermolekularen Anteile bis auf ca. 5 % erreicht werden. Mit einem Kationenaustauscherharz wurden zwar die höhermolekularen Anteile bis auf ca. 1 % abgetrennt, aber die Bindungskapazität des Harzes für das Preproinsulin erwies sich
25 als unbefriedigend.

Es wurde nun überraschend gefunden, dass die Kombination von einer Chromatographie an einem Anionenaustauscherharz im Durchflußmodus mit einer direkt anschließenden Chromatographie an einem Kationenaustauscherharz im
30 Adsorptionsmodus deutlich bessere Resultate lieferte. Die vorliegende Erfindung bezieht sich deshalb auf ein Verfahren zur effektiven Abtrennung der

höhermolekularen Substanzen aus einer wässrigen Lösung des Preproinsulins bei gleichzeitiger hoher Konzentrierung des monomeren Preproinsulins.

Erfindungsgemäß wird eine verdünnte wässrige Lösung eines Preproinsulins, wie sie
5 während des Herstellungsprozesses von Insulin entsteht, bei pH 7,0 bis 9,0 ,
vorzugsweise bei pH 7,5 bis 8,5 und einer Leitfähigkeit von 5 bis 7 mS/cm über eine
Vorsäule gepumpt, die mit einem Anionenaustauscherharz, z.B. Source 30 Q, gefüllt
ist. Dabei wird das monomere Preproinsulin nicht an das Harz gebunden, sondern läuft
mit dem Permeat durch die Säule. Im Gegensatz dazu wird der größte Teil der
10 höhermolekularen Substanzen, inklusive der polymeren Preproinsuline, an das Harz
adsorbiert und damit vom Preproinsulin abgetrennt. Das Wertstoff-haltige Permeat
dieser Vorsäule wird in line mit Salzsäure auf pH 3,0 bis 5,5 , vorzugsweise auf pH 4,0
bis 5,0 eingestellt und anschließend direkt auf eine zweite Säule gepumpt, die mit
einem Kationenaustauscherharz, z.B. Source 30 S, gefüllt ist. An dieses Harz wird das
15 Preproinsulin adsorbiert und Verunreinigungen werden mit dem Permeat aus der
Säule gespült. Mit Hilfe eines Elutionspuffers, der Natriumchlorid mit einer linear
ansteigenden Konzentration von 1 bis 20 g/L, vorzugsweise 2,5 bis 15,0 g/L enthält,
wird das Preproinsulin desorbiert. Das gereinigte Preproinsulin wird in einer
Hauptfraktion aufgefangen, wogegen weitere Verunreinigungen in einer Vor- und
20 Nachfraktion abgetrennt werden. In der Hauptfraktion, die > 90 % der Ausgangsmenge
an Preproinsulin enthielt, wurde eine Konzentration von 15 bis 20 g/L gemessen
(Konzentrierungsfaktor $F = 20 - 25$). Die höhermolekularen Substanzen wurden bis auf
einen Anteil von < 0,1 % abgetrennt. Das auf diese Weise gereinigte Preproinsulin
kann durch Kristallisation aus der Lösung zwischenisoliert werden oder die Lösung
25 kann direkt der Prozessstufe der enzymatischen Spaltung zugeführt werden.

Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur chromatographischen Reinigung
von Preproinsulin der Formel 1,



in der

30

X

a) ein genetisch kodierbarer Aminosäurerest oder
 b) ein Peptid mit 2 bis 35 Aminosäureresten, wobei am Anfang und am Ende des Peptids jeweils ein basischer Aminosäurerest, insbesondere Arg steht, und für den Fall, dass das Peptid aus mehr als 3
 35 Aminosäureresten besteht, am Anfang und Ende des Peptids jeweils zwei basische Aminosäurereste, insbesondere Arg und/oder Lys stehen,

R^1

a) ein Wasserstoffatom,
 b) ein genetisch kodierbarer Aminosäurerest oder
 40 c) ein Peptid mit 2 bis 15 Aminosäureresten,

40

R^2

ein genetisch kodierbarer Aminosäurerest ist und

und die Reste A1 – A20 der Aminosäuresequenz der A-Kette von Humaninsulin oder einem Insulinanalogon entsprechen und die Reste B1 – B30 der Aminosäuresequenz der B-Kette von Humaninsulin oder einem Insulinanalogon entsprechen;

5

bei dem höhermolekulare Substanzen aus einer wäßrigen Lösung des Preproinsulins durch eine erste Chromatographie an einem Anionenaustauscher im Durchflussmodus und eine anschließende zweite Chromatographie an einem Kationenaustauscher im Adsorptionsmodus abgetrennt werden;

10

wobei das Preproinsulin folgende Aminosäuresequenz haben kann:

Ala-Thr-Thr-Ser-Thr-Gly-Asn-Ser-Ala-Arg-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-
Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-
15 Thr-Pro-Lys-Thr-Arg-Arg-Glu-Ala-Glu-Asp-Pro-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-Arg-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-
Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn; (SEQ ID NO: 2)

20 Ala-Thr-Thr-Ser-Thr-Gly-Asn-Ser-Ala-Arg-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-
Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-
Thr-Pro-Lys-Thr-Arg-Arg-Glu-Ala-Glu-Asp-Pro-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-Arg-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-
25 Glu-Asn-Tyr-Cys-Gly; (SEQ ID NO: 3)

Ala-Thr-Thr-Ser-Thr-Gly-Asn-Ser-Ala-Arg-Phe-Val-Lys-Gln-His-Leu-Cys-Gly-
Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-
Thr-Pro-Glu-Thr-Arg- Asp-Val-Pro-Gln-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-
30 Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-Lys-Arg-Gly-Ile-Val-Glu-
Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn (SEQ
ID NO: 4).

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren wie oben beschrieben zur Abtrennung von Fremdsubstanzen aus den Lösungen von Preproinsulinen, welche die Denaturierung von Insulin induzieren.

5

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren wie oben beschrieben, dadurch gekennzeichnet, dass die zweite Chromatographie bei einem pH-Wert von 3,0 bis 5,5 durchgeführt wird.

- 10 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren wie oben beschrieben, dadurch gekennzeichnet, dass die zweite Chromatographie bei einem Druck von 1 bis 30 bar durchgeführt wird.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Insulin
15 durch Expression ungefalteten Preproinsulins, umfassend die Schritte:

- a) Fermentation von gentechnisch veränderten Mikroorganismen, welche ungefaltetes Preproinsulin exprimieren
- b) Ernten der Mikroorganismen und Zellaufschluß
- c) Isolierung der Einschlusskörper mit ungelöstem, ungefalteten Preproinsulin
- 20 d) Auflösen des Preproinsulins mit korrekter Faltung der Peptidkette und mit gleichzeitiger Schließung der Disulfidbrücken zum Preproinsulin und anschließendem Durchlaufen eines Verfahren zur chromatographischen Reinigung von Preproinsulin der Formel 1 wie oben beschrieben
- e) Enzymatische Spaltung des Preproinsulins zum Humaninsulin
- 25 f) Reinigung des Humaninsulins
- g) Kristallisation des Humaninsulins und Trocknung

Im folgenden wird die Erfindung anhand der Beispiele näher erläutert, ohne sich darauf
30 zu beschränken.

Beispiele:

Für die in den nachfolgenden Beispielen 1 bis 3 beschriebene Reinigung verschiedener Preproinsuline der Formel 1 wurde die Ausgangslösung in bekannter
5 Weise (EP 0 489 780 und EP 0 600 372) entsprechend den oben erwähnten Prozessstufen a, b, c und d wie folgt hergestellt:

- Während der Fermentation der Mikroorganismen (Prozessstufe a) wurden in den E.-Coli-Zellen Einschlußkörper gebildet, die das Fusionsprotein mit der
10 Aminosäuresequenz des Preproinsulins enthielten. Nach Beendigung der Fermentation wurden die Zellen durch Zentrifugation isoliert und durch die übliche Hochdruckhomogenisation aufgeschlossen (Prozessstufe b). Die dabei freigesetzten unlöslichen Einschlußkörper wurden durch Zentrifugation isoliert und auf der Zentrifuge mit Wasser gewaschen (Prozessstufe c). In der nachfolgenden
15 Prozessstufe d wurden die Fusionsprotein-Einschlusskörper in einer 8 M Guanidinhydrochlorid-Lösung bei pH 10,8 gelöst. Nach Verdünnen mit Wasser und Zugabe von Cysteinhydrochlorid wurde das Fusionsprotein bei pH 10,8 und 4 °C unter Schließung der 3 Disulfidbrücken zu dem Preproinsulin der Formel 1 gefaltet. Anschließend wurde die Lösung mit 10 %iger Salzsäure auf pH 5 eingestellt und dabei
20 Fremdproteine ausgefällt, die durch Zentrifugation abgetrennt wurden. Der Zentrifugenüberstand enthielt 0,6 bis 0,8 g/L monomeres Preproinsulin. Die Reinheit des Preproinsulins wurde mit der HPLC-RP-Analyse zu ca. 65 Flächen-% bestimmt. Mit der HPLC-GPC-Analyse wurde ein Anteil von ca. 45 Flächen-% höhermolekulare Verunreinigungen ermittelt.
25 HPLC-RP-Analyse

- | | |
|--------------|--|
| Säule: | LiChroCART 250-4 der Fa. Merck (Superspher 100-RP18e) |
| Instrument: | Waters 2690 |
| Software: | Waters Millenium |
| 30 Gradient: | A: 25 Vol-% Acetonitril, 0,3 M NaCl in 0,05 M Phosphatpuffer
pH 2,5 |

B: 65 Vol-% Acetonitril, 0,05 M NaCl in 0,05 M Phosphatpuffer pH 2,5

Der Gradient ist gekennzeichnet durch die folgenden Mengen von Puffer B nach den entsprechenden Laufzeiten:

- 5 0 Min. 4,0 % ; 20 Min. 17,0 % ; 30 Min. 37,0 % ; 40 Min. 4,0 %
- Temperatur: 35 °C
- Aufgabevolumen: 10 µl
- Gesamtlaufzeit: 55 Min.
- Flußrate: 1,0 ml/Min.
- 10 Detektion: 214 nm (Waters 2487)

Zur Ermittlung des Gehalts an Preproinsulin in der Aufgabelösung wurde der Quotient aus der Peakfläche des Preproinsulins in der Analysenprobe und der entsprechenden Peakfläche einer Standardsubstanz gebildet. Für die Ermittlung des Reinheitsgrades wurde der Quotient aus der Peakfläche des Preproinsulins und der Summe der Peakflächen von allen eluierbaren Substanzen in der Analysenprobe gebildet.

HPLC-GPC-Analyse

20

- Säule: 2 Säulen in Serie, Edelstahl L = 300 mm; ID = 7,8 mm
- Instrument: Pumpe: Waters 510 / Autosampler: Wisp 717
- Software: Waters Millenium
- Stationäre Phase: Shodex Protein KW 802.5 120-7-Diol
- 25 Trenngrenzen: 2 000 bis 80 000 Dalton
- Mobile Phase: 30 Vol-% Acetonitril, 3,5 M Essigsäure, pH 3,0 eingestellt mit Ammoniakwasser
- Gradient: isocratic
- Temperatur: Raumtemperatur
- 30 Aufgabevolumen: 100 µl
- Gesamtlaufzeit: 65 Min.
- Flußrate: 0,5 ml/Min

Detektion: 276 nm (Waters 2487)

Zur Ermittlung des Anteils an höhermolekularen Substanzen wurde der Quotient aus den Peakflächen aller höhermolekularen Substanzen, die zeitlich vor dem monomeren Preproinsulin eluiert wurden, und der Summe der Peakflächen von allen eluierbaren Substanzen gebildet. Die Retentionszeit für das monomere Preproinsulin wurde mit einer Standardsubstanz ermittelt.

10 Beispiel 1

Aus dem entsprechend gentechnisch modifizierten E.-Coli-Zellen wurde nach Abschluß der oben erwähnten Prozessstufen a, b, c und d eine Lösung des Preproinsulins mit folgender Aminosäuresequenz erhalten:

15

Ala-Thr-Thr-Ser-Thr-Gly-Asn-Ser-Ala-Arg-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-
 Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr-
 Arg-Arg-Glu-Ala-Glu-Asp-Pro-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-Arg-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-
 20 Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn (SEQ ID NO: 2)

Dieses Preproinsulin entspricht der Formel 1, dabei ist

- X eine Peptidkette mit 35 Aminosäureresten mit der Sequenz des C-
 25 Peptids vom Affen
- R1 eine Peptidkette mit 10 Aminosäureresten mit der Sequenz:
 Ala-Thr-Thr-Ser-Thr-Gly-Asn-Ser-Ala-Arg (SEQ ID NO: 5)
- R2 der Aminosäurerest Asn (identisch mit A21 der A-Kette vom
 Humaninsulin)
- 30 A1-A20 Peptidkette mit der Sequenz (nur A1 bis A20) der A-Kette vom
 Humaninsulin
- B1-B30 Peptidkette mit der Sequenz der B-Kette vom Humaninsulin

Zur Reinigung der Preproinsulin-Lösung wurde eine Apparatur verwendet, die hauptsächlich aus zwei in Reihe angeordneten Chromatographie-Säulen und einem dazwischen angeordneten Rührgefäß bestand. In dem Rührgefäß wurde inline der pH-
5 Wert der Lösung zwischen den beiden Säulen umgestellt.

In der ersten Chromatographie-Säule (Hersteller: Pharmacia, Durchmesser: 5 cm) wurde ein Gelbett (Betthöhe: 14 cm, Bettvolumen: 275 ml) mit dem Anionenaustauscherharz DEAE-Sepharose fast flow (Hersteller: Pharmacia Biotech;
10 Prod.-Nr. 17-0709-05) hergestellt. Die Säule wurde von oben nach unten und bei Normaldruck von 1 bar betrieben. Die Flussrate betrug 2000 ml/h. Vor der Säule waren ein Mehrwegeventil, eine Aufgabepumpe (Ismatec MV) und eine Blasenfalle installiert. Über das Mehrwegventil wurden nacheinander folgende Lösungen:

- 15 8,1 L Aufgabelösung
- 2,3 L Verdrängungspuffer
- 1,4 L Waschpuffer
- 1,4 L Regenerationslösung
- 2 L Equilibrierpuffer

20

auf die Säule gepumpt. Nach der Säule war eine UV-Sonde (275 nm mit Messwertregistrierung) und ein weiteres Mehrwegeventil installiert. Über das zweite Mehrwegventil wurden ca. 10,2 L Permeatfraktion in das oben erwähnte Rührgefäß und anschließend ca. 1 L Waschfraktion in ein Sammelgefäß geleitet. Die übrigen
25 Permeate wurden über das Mehrwegeventil in den Biokanal entsorgt.

Die Chromatographie an dem Anionenaustauscher wurde im Durchflussmodus betrieben, d.h. die Bedingungen (pH 8,3 ; LF = 6,1 mS/cm) wurden so gewählt, dass der Wertstoff Preproinsulin nicht an das Gel gebunden, sondern während der Produktaufgabe mit dem Permeat durch die Säule gespült wurde. Dagegen wurden
30 Verunreinigungen an das Gel adsorbiert und mit dem Waschpuffer und der Regenerierlösung ausgeschleust.

Die verwendeten Lösungen hatten folgende Zusammensetzung:

Aufgabelösung für Säule 1:

Ausgangslösung (Zentrifugenüberstand)		8,0	L	
Natriumchlorid-Lösung 25 %ig (w/w)		100	ml	ml/L
				12,5
Natronlauge 10 %ig (w/w)	ca.	4,5	ml	ml/L
				0,6
	pH	8,3		
Leitfähigkeit	LF	6,1	mS/cm	
			m	
Temperatur	ca.	5	°C	

Gereinigtes Wasser		1	L	
Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan		4,0	g/L	
Natriumchlorid		2,5	g/L	
Salzsäure 25 %ig (w/w)	ca.	2,5	ml/L	
	pH	8,0		
Leitfähigkeit	ca.	5,7	mS/cm	
Temperatur			Raumtemperatur	

5

Gereinigtes Wasser		1	L	
Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan		5,0	g/L	
Natriumchlorid		15	g/L	
Salzsäure 25 %ig (w/w)	ca.	3	ml/L	
	pH	8,0		

16

Leitfähigkeit	ca.	24	mS/cm
Temperatur			Raumtemperatur

Regenerationslösung für Säule 1 und 2:

Gereinigtes Wasser		0,91	L		
Natriumchlorid		40	g	40	g/L
Natronlauge 33 %ig (w/w)		0,09	L	1	mol/L

Equilibrierpuffer für Säule 1:

Gereinigtes Wasser		1	L		
Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan		5,0	g/L		
Natriumchlorid		2,0	g/L		
Salzsäure 25 %ig (w/w)	ca.	3	ml/L		
	pH	8,0			
Leitfähigkeit	ca.	5,1	mS/c		
			m		
Temperatur					Raumtemperatur

5

Im Säulenauslauf wurde die Permeatfraktion, die den Wertstoff Preproinsulin enthielt, und die Waschfraktion, die den größten Teil der höhermolekularen Verunreinigungen enthielt, aufgefangen:

10

1. ca. 10,2 L Permeatfraktion
(mit Beginn der Aufgabelösung, ab UV-Wert 20 %
aufsteigend

bis UV-Wert 35 % absteigend, während der Produkt-Verdrängung)

2. ca. 1 L Waschfraktion
 5 (während der Aufgabe des Waschpuffers, ab UV-Wert 30 % aufsteigend bis UV-Wert 40 % absteigend)

Alle übrigen Permeate wurden in den Biokanal entsorgt.

10 Das im Auslauf der Säule 1 gemessene UV-Diagramm ist in Figure 1 gezeigt.

Die Permeatfraktion der ersten Säule wurde in dem Zwischengefäß (Nennvolumen: 4 L, mit Rührer, pH-Sonde und Einleitungsrohr) inline mit 90 %iger Milchsäure auf pH 3,5 eingestellt und anschließend direkt auf die zweite Chromatographie-Säule
 15 gepumpt.

In der zweiten Chromatographie-Säule (Hersteller: Pharmacia, Durchmesser: 5 cm) wurde ein Gelbett (Betthöhe: 10,5 cm, Bettvolumen: 206 ml) mit dem Kationenaustauscher Source 30 S (Hersteller: Pharmacia Biotech; Prod.-Nr.: 17-1273-
 20 04) hergestellt. Die Säule wurde von oben nach unten und bei Normaldruck von 1 bar betrieben. Die Flussrate betrug ebenfalls 2000 ml/h. Vor der Säule war ein Mehrwegeventil, eine Aufgabepumpe und eine Blasenfalle installiert. Über das Mehrwegeventil wurden nacheinander folgende Lösungen:

- 25 10,2 L Aufgabelösung (= Permeatfraktion der Säule 1, auf pH 3,5 eingestellt)
 0,5 L Verdrängungspuffer
 3,0 L Elutionspuffer A/B (aus gleichen Teilen A und B)
 2,3 L Regenerationslösung
 30 2 L Equilibrierpuffer

auf die Säule gepumpt. Nach der Säule war eine UV-Sonde (275 nm mit Messwertregistrierung) und ein weiteres Mehrwegeventil installiert. Über das zweite Mehrwegeventil wurden ca. 1 L Hauptfraktion in ein Sammelgefäß geleitet. Die übrigen Permeate wurde über das Mehrwegeventil in den Biokanal entsorgt.

5

Die Chromatographie an dem Kationenaustauscher wurde im Adsorptionsmodus betrieben, d.h. der Wertstoff Preproinsulin wurde während der Produktaufgabe an das Gel adsorbiert und (nach dem Verdrängen der Aufgabelösung) mit dem Elutionspuffer A/B wieder desorbiert. Um einen optimalen Reinigungseffekt zu erzielen, wurde ein

10 linear ansteigender Natriumchlorid-Gradient im Elutionspuffer angewendet.

Die verwendeten Lösungen hatten folgende Zusammensetzung:

Aufgabelösung für Säule 2:

Permeatfraktion der Säule	ca.	10,2	L	
1				
Milchsäure 90 %ig		14,3	ml	ml/L
				1,4
	pH	3,5		
Leitfähigkeit	ca.	6,3	mS/cm	
Temperatur	ca.	5	°C	

15

Verdrängungspuffer für Säule 2:

Gereinigtes Wasser		1	L	
Milchsäure 90 %ig		8,3	ml	mol/L
				0,1
Natriumchlorid		2,5	g	g/L
				2,5
Natronlauge 10 %ig (w/w)	ca.	8	ml	
	pH	3,5		
Leitfähigkeit	ca.	8	mS/c	

20

Natronlauge 10 %ig (w/w)	ca.	9	ml
	pH	3,5	
Leitfähigkeit	ca.	8,5	mS/cm
Temperatur		Raumtemperatur	

Im Säulenauslauf wurden die Hauptfraktion, die den Wertstoff Preproinsulin enthielt, aufgefangen:

5

ca. 1,0 L Hauptfraktion
(während der Elution, ab UV-Wert 65 % aufsteigend bis UV-Wert 76 % absteigend)

10 Alle übrigen Permeate wurden in den Biokanal verworfen.

Das im Auslauf der Säule 2 gemessene UV-Diagramm ist in Figure 2 gezeigt.

In der gereinigten Lösung (Hauptfraktion der Säule 2) wurden 15 g/L Preproinsulin mit einem Reinheitsgrad von 89 Flächen-% gemessen (HPLC-RP-Analyse). Die Ausbeute betrug 91 % bezogen auf die Menge an Preproinsulin in der Ausgangslösung. Mit der HPLC-GPC-Analyse wurden 0,2 Flächen-% höhermolekulare Anteile bestimmt.

20 Beispiel 2

Aus dem entsprechend gentechnisch modifizierten E.-Coli-Zellen wird nach Abschluß der oben erwähnten Prozessstufen a, b, c und d eine Lösung des Preproinsulins mit folgender Aminosäuresequenz erhalten:

25

Ala-Thr-Thr-Ser-Thr-Gly-Asn-Ser-Ala-Arg-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr-Arg-Arg-Glu-Ala-Glu-Asp-Pro-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-Arg-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Gly (SEQ ID NO: 3)

Dieses Preproinsulin entspricht der Formel 1, dabei ist

5

X eine Peptidkette mit 35 Aminosäureresten mit der Sequenz des C-Peptids vom Affen

R1 eine Peptidkette mit 10 Aminosäureresten mit der Sequenz:
Ala-Thr-Thr-Ser-Thr-Gly-Asn-Ser-Ala-Arg (SEQ ID NO: 5)

10 R2 der Aminosäurerest Gly

A1-A20 Peptidkette mit der Sequenz (nur A1 bis A20) der A-Kette vom Humaninsulin

B1-B30 Peptidkette mit der Sequenz der B-Kette vom Humaninsulin

15 Zur Reinigung der Preproinsulin-Lösung wurde wieder eine Apparatur verwendet, die hauptsächlich aus zwei in Reihe angeordneten Chromatographie-Säulen und einem dazwischen angeordneten Rührgefäß bestand. In dem Rührgefäß wurde inline der pH-Wert der Lösung zwischen den beiden Säulen umgestellt. Die Apparate für die zweite Chromatographie-Stufe waren druckstabil ausgelegt.

20

Die Chromatographie auf der Säule 1 und die Umstellung des pH-Wertes in dem Zwischengefäß wurde wie im Beispiel 1 beschrieben durchgeführt, so dass die Beschreibung und die Werte hier nicht noch einmal genannt werden.

25 In der zweiten Chromatographie-Säule (Hersteller: Prochrom, Durchmesser: 5 cm, Material: Edelstahl) wurde ein Gelbett (Betthöhe: 10 cm, Bettvolumen: 196 ml) mit dem Kationenaustauscher Source 30 S (Hersteller: Pharmacia Biotech; Prod.-Nr.: 17-1273-04) hergestellt. Die Säule wurde von oben nach unten und bei einem Arbeitsdruck von 10 bar betrieben. Die Flussrate betrug 3500 ml/h. Vor der Säule war ein
30 Mehrwegeventil, eine Aufgabepumpe (Hersteller: Besta; Typ: HD2-300) installiert. Über das Mehrwegeventil wurden nacheinander folgende Lösungen:

- 10,2 L Aufgabelösung (= Permeatfraktion der Säule 1, auf pH 4,6 eingestellt)
- 0,5 L Verdrängungspuffer
- 3,0 L Elutionspuffer A/B (aus gleichen Teilen A und B)
- 5 2,3 L Regenerationslösung
- 2 L Equilibrierpuffer

auf die Säule gepumpt. Nach der Säule war eine UV-Sonde (275 nm mit Messwertregistrierung) und ein weiteres Mehrwegeventil installiert. Über das zweite Mehrwegeventil wurde die Hauptfraktion, die das gereinigte Preproinsulin enthielt, in
 10 ein Sammelgefäß geleitet. Die übrigen Permeate wurden über das Mehrwegeventil in den Biokanal entsorgt.

Die Chromatographie an dem Kationenaustauscher wurde im Adsorptionsmodus betrieben, d.h. der Wertstoff Preproinsulin wurde während der Produktaufgabe an das
 15 Gel adsorbiert und (nach dem Verdrängen der Aufgabelösung) mit dem Elutionspuffer A/B wieder desorbiert. Um einen optimalen Reinigungseffekt zu erzielen, wurde ein linearer Natriumchlorid-Gradient im Elutionspuffer angewendet.

Die verwendeten Lösungen hatten folgende Zusammensetzung:

20

Aufgabelösung für Säule 2:

Permeatfraktion der Säule 1	ca.	10,2	L	
Milchsäure 90 %ig		12,2	ml	1,2 ml/L
	pH	4,6		
Leitfähigkeit	ca.	6,7	mS/cm	
Temperatur	ca.	5	°C	

Verdrängungspuffer für Säule 2:

Gereinigtes Wasser		1	L	
Milchsäure 90 %ig		8,3	ml	mol/L

23

Natriumchlorid		2,5	g	0,1	
					g/L
				2,5	
Natronlauge 10 %ig (w/w)	ca.	27	ml		
	pH	4,6			
Leitfähigkeit	ca.	8	mS/cm		
Temperatur					
					Raumtemperatur

Elutionspuffer A für Säule 2:

Der Elutionspuffer A ist mit dem Verdrängungspuffer für die Säule 2 identisch.

Elutionspuffer B für Säule 2:

Gereinigtes Wasser		1	L		
Milchsäure 90 %ig		8,3	ml		mol/L
				0,1	
Natriumchlorid		15,0	g		g/L
				15,0	
Natronlauge 10 %ig (w/w)	ca.	27	ml		
	pH	4,6			
Leitfähigkeit	ca.	25	mS/cm		
Temperatur					
					Raumtemperatur

5

Regenerationslösung für Säule 1 und 2:

Gereinigtes Wasser		0,91	L		
Natriumchlorid		40	g	40	g/L
Natronlauge 33 %ig (w/w)		0,09	L	1	mol/L

Equilibrierpuffer für Säule 2:

Gereinigtes Wasser		1	L	
Milchsäure 90 %ig		8,3	g	mol/L
				0,1
Natriumchlorid		2,9	g/L	
Natronlauge 10 %ig (w/w)	ca.	26	ml	
	pH	4,6		
Leitfähigkeit	ca.	8,7	mS/cm	
Temperatur				Raumtemperatur

Im Säulenauslauf wurden die Hauptfraktion, die den Wertstoff Preproinsulin enthielt, 5 aufgefangen:

ca. 0,9 L Hauptfraktion
(während der Elution, ab UV-Wert 65 % aufsteigend bis UV-Wert 76 % absteigend)

10 Alle übrigen Permeate wurden in den Biokanal verworfen.

In der gereinigten Lösung (Hauptfraktion der Säule 2) wurden 17 g/L Preproinsulin mit einem Reinheitsgrad von 93 Flächen-% gemessen (HPLC-RP-Analyse). Die Ausbeute betrug 92 % bezogen auf die Menge an Preproinsulin in der Ausgangslösung. Mit der HPLC-GPC-Analyse wurden <0,1 Flächen-% höhermolekulare Anteile bestimmt.

15

Beispiel 3

Aus dem entsprechend gentechnisch modifizierten E.-Coli-Zellen wird nach Abschluß
20 der oben erwähnten Prozessstufen a, b, c und d eine Lösung des Preproinsulins mit folgender Aminosäuresequenz erhalten:

Ala-Thr-Thr-Ser-Thr-Gly-Asn-Ser-Ala-Arg-Phe-Val-Lys-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-
 Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Glu-Thr-
 Arg- Asp-Val-Pro-Gln-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-
 Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-Lys-Arg-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-
 5 Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn (SEQ ID NO: 4)

Dieses Preproinsulin entspricht der Formel 1, dabei ist

- X eine Peptidkette mit 29 Aminosäureresten mit der Sequenz:
 10 Arg- Asp-Val-Pro-Gln-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-
 Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-Lys-Arg (SEQ ID NO: 1)
- R1 eine Peptidkette mit 10 Aminosäureresten mit der Sequenz:
 Ala-Thr-Thr-Ser-Thr-Gly-Asn-Ser-Ala-Arg (SEQ ID NO: 5)
- R2 der Aminosäurerest Asn (A21 der A-Kette vom Humaninsulin)
- 15 A1-A20 Peptidkette mit der Sequenz (nur A1 bis A20) der A-Kette vom
 Humaninsulin B1-B30 Peptidkette mit einer analogen Sequenz zur B-
 Kette vom Humaninsulin, d.h. mit einem Austausch von Lys gegen Val in
 der Position B3 und einem Austausch von Glu gegen Lys in Position B29.

Zur Reinigung der Preproinsulin-Lösung wurde die gleiche Apparatur verwendet, die
 20 im Beispiel 1 verwendet wurde.

Für die Chromatographie auf der Säule 1 wurde diesmal das Anionenaustauscherharz
 Source 30 Q (Hersteller: Pharmacia Biotech; Prod.-Nr.: 17-1275-04) verwendet. Zur
 Regeneration dieses Gels wurde die doppelte Menge an Regenerationslösung im
 25 Vergleich zu den Beispielen 1 und 2 gebraucht. Die übrigen Parameter der ersten
 Chromatographie, wie Zusammensetzung und Volumina der Lösungen, waren die
 gleichen wie in den Beispielen 1 und 2 beschrieben.

Ebenso wurde die Umstellung des pH-Wertes in dem Zwischengefäß wie im Beispiel 1
 30 beschrieben durchgeführt.

Die zweite Chromatographie wurde diesmal bei einem Arbeitsdruck von 15 bar durchgeführt. Alle übrigen Parameter der zweiten Chromatographie waren die gleichen wie im Beispiele 2 beschrieben.

- 5 In der gereinigten Lösung (Hauptfraktion der Säule 2) wurden 17 g/L Preproinsulin mit einem Reinheitsgrad von 92,5 Flächen-% gemessen (HPLC-RP-Analyse). Die Ausbeute betrug 91 % bezogen auf die Menge an Preproinsulin in der Ausgangslösung. Mit der HPLC-GPC-Analyse wurden <0,1 Flächen-% höhermolekulare Anteile bestimmt.

10

Denaturierungstest

- Mit dem Denaturierungstest (Tabelle 1) wird gezeigt, dass die höhermolekularen polymeren Formen der Preproinsuline, wie sie während der Faltungsreaktion
15 entstehen, die Denaturierung von nativem Insulin induzieren können.

- In dem Denaturierungstest wurde natives Insulin glargin, ein Produkt der Firma Aventis Deutschland GmbH, das nach der enzymatischen Spaltung des im Beispiel 2 beschriebenen Preproinsulins erhalten wird, kristallisiert. Überraschenderweise
20 konnten wir in eigenen Versuchen zeigen, dass unter den Bedingungen der Kristallisation des Insulin glargin (pH 6,1 und 26 °C), es zu einer Denaturierung des nativen Insulins kommt, wenn dem Kristallisieransatz Substanzen zugesetzt werden, die die Denaturierung von Insulin induzieren können.

- 25 Für die Kristallisieransätze wurde eine Standard-Lösung folgender Zusammensetzung hergestellt:

	Insulin glargin	5	g/L
	Zitronensäure	5,2	mmole/L
30	Zinkchlorid	3	mmole/L
	Natriumchlorid	0,5	g/L
	n-Propanol	7	%(v/v)

gereinigtes Wasser ad 500 ml
mit 1 N Salzsäure pH 3

Die Lösung wurde durch ein Membranfilter mit 0,1 µm Porenweite filtriert.

5 In dem Denaturierungstest wurden zu dieser sauren Standardlösung Lösungen die verschiedenen Testsubstanzen zugesetzt: Die Waschfraktion der Säule 1, die die abgetrennten polymeren Formen der Preproinsuline in einer Konzentration von 5 g/L enthielt oder die Hauptfraktion der Säule 2, die das gereinigte Preproinsulin in einer Konzentration von 15 bzw. 17 g/L enthielt. Als weiterer Beweis, dass die beobachteten
10 Phänomene durch die Denaturierung von Insulin hervorgerufen wurden, diente der Zusatz von 10 ml einer 0,1 %igen wässrigen Stammlösung von Poloxamer 171. Es ist bekannt, dass Poloxamer 171 die Denaturierung von Insulin an hydrophoben Grenzflächen unterdrücken kann (H.Thurow and K.Geisen, Diabetologia (1984) 27, 212-218 and EP 0 018 609).

15

Anschließend wurden die Lösungen auf 26 °C temperiert und unter Rühren mit 10 %iger Natronlauge auf pH 6,1 eingestellt, wobei das Insulin amorph ausfiel. Die amorphe Suspension wurde bei 26 °C über 50 Stunden gerührt. Nach dieser Zeit waren in allen Ansätzen Insulinkristalle entstanden.

20

Zur Auswertung der Ansätze wurden Proben unter dem Mikroskop beurteilt, wobei auf das Auftreten von amorphen Partikeln (Schleier) im Hintergrund bzw. zwischen den Insulinkristallen geachtet wurde. Zusätzlich wurde jeder Ansatz in 2 etwa gleichgroße Teile geteilt. Der 1. Teil wurde zur Untersuchung des Sedimentationsverhaltens in ein
25 250 ml - Messzylinder gegeben, wobei nach 60 Min. Stehen bei Raumtemperatur das Volumen des Sediments und die Klarheit des Überstandes bewertet wurden. Der zweite Teil wurde mit 1 N Salzsäure auf pH 3 eingestellt, wobei nach Auflösen der Insulinkristalle die Klarheit der entstandenen Lösung bewertet wurde.

30 Das Ergebnis des Denaturierungstests ist in Tabelle 1 gezeigt. In den Kontrollproben 174 A und 188 A ohne Zusatz der Polymerfraktion war keine Denaturierung beobachtet worden. Im Mikroskop waren Kristalle vor einem klaren Hintergrund zu

erkennen. Nach 60 Minuten war die Kristalle sedimentiert, wobei eine kompakten Sediment und ein klarer Überstand entstanden waren. Nach Auflösen der Kristalle bei pH 3 war eine klare Lösung entstanden. Dagegen wurde in den Proben 174 B, 188 B bzw. 174 C, bei denen zum Kristallisieransatz 1 ml bzw. 5 ml Polymerfraktion 5 zugesetzt worden waren, eine deutliche Denaturierung von Insulin glargin beobachtet. Im Mikroskop war zwischen den Kristallen ein amorpher Schleier zu erkennen. Im Sedimentationstest waren voluminöse Sedimente mit einem Sedimentvolumen von 50 bis 90 ml (aus 250 ml Kristallsuspension) entstanden. Nach Wiederauflösen der Kristalle bei pH 3 waren mehr oder weniger trübe amorphe Suspensionen entstanden.

10 In Gegenwart von 20 ppm Poloxamer 171 war bei einem Zusatz von 1 ml Polymerlösung (188 C) keine Denaturierung beobachtet worden. In den Testansätzen 174 D, 174 E und 174 F, denen gereinigte Preproinsuline (Hauptfraktion der Säule 2 aus den Beispielen 1, 2 und 3) zugesetzt worden waren, konnte ebenfalls keine Denaturierung von Insulin glargin beobachtet werden.

15

Ähnliche, hier nicht gezeigte Ergebnisse wurden in einem analogen Denaturierungstest erhalten, bei dem Humaninsulin kristallisiert wurde.

Tabelle 1

Einfluß der höhermolekularen Verunreinigungen auf die Denaturierung von Insulin Glargin

Kristallisie- r- ansatz Nr.	Zusätze zum Kristallisationsansatz	Mikroskopisches Bild Aussehen des Hintergrundes (zwischen den Rhomboeder- Kristallen)	Aussehen nach Lösen der Kristalle bei pH 3	Sedimentations- verhalten der Kristallsuspension
174 A	Keine	klar	klar	+++
174 B	1 ml Waschrkt. Säule 1 *	Amorphe Partikel	schwach trüb	+ - -
174 C	5 ml Waschrkt. Säule 1 *	stärker amorphe Partikel	trüb	- - -
174 D	1 ml Hauptfrkt. Beispiel 1 **	klar	klar	+++
174 E	1 ml Hauptfrkt. Beispiel 2 ***	klar	klar	+++
174 F	1 ml Hauptfrkt. Beispiel 3 ****	klar	klar	+++
188 A	Keine	klar	klar	+++
188 B	1 ml Waschrkt. Säule 1 *	Amorphe Partikel	trüb	- - -
188 C	1 ml Waschrkt. Säule 1 * und 20 ppm Poloxamer 171	vereinzelt amorphe Partikel	klar	+++

- Kristallisieransätze von jeweils 500 ml mit 2500 mg Insulin Glargin (= 5 g/L).
Säule 1 aus Beispiel 2 enthielt 5 g/L Protein.
- + + + = Nach ca. 60 Min. ein Sediment von 3 bis 5 ml aus 250 ml Suspension.
2 aus Beispiel 1 enthielt 15 g/L Preproinsulin
- 5 - - - = Nach ca. 60 Min. ein Sediment bis zu 90 ml aus 250 ml Suspension.
2 aus Beispiel 2 enthielt 17 g/L Preproinsulin
- * Die Waschfraktion der
** Die Hauptfraktion der Säule
*** Die Hauptfraktion der Säule
**** Die Hauptfraktion der Säule 2 aus Beispiel 3
enthielt 17 g/

- b) ein genetisch kodierbarer Aminosäurerest oder
- c) ein Peptid mit 2 bis 15 Aminosäureresten,

R² ein genetisch kodierbarer Aminosäurerest ist und

5

und die Reste A1 – A20 der Aminosäuresequenz der A-Kette von Humaninsulin oder einem Insulinanalogon entsprechen und die Reste B1 – B30 der Aminosäuresequenz der B-Kette von Humaninsulin oder einem Insulinanalogon entsprechen;

10

bei dem höhermolekulare Substanzen aus einer wäßrigen Lösung des Preproinsulins durch eine erste Chromatographie an einem Anionenaustauscher im Durchflussmodus und eine anschließende zweite Chromatographie an einem Kationenaustauscher im Adsorptionsmodus abgetrennt werden.

15

2. Verfahren zur chromatographischen Reinigung des gentechnologisch hergestellten Preproinsulins der Formel 1, wobei das Preproinsulin folgende Aminosäuresequenz hat:

20

Ala-Thr-Thr-Ser-Thr-Gly-Asn-Ser-Ala-Arg-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr-Arg-Arg-Glu-Ala-Glu-Asp-Pro-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-Arg-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn (SEQ ID NO: 2).

25

3. Verfahren zur chromatographischen Reinigung des gentechnologisch hergestellten Preproinsulins der Formel 1, wobei das Preproinsulin folgende Aminosäuresequenz hat:

30

Ala-Thr-Thr-Ser-Thr-Gly-Asn-Ser-Ala-Arg-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-
Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-
Thr-Pro-Lys-Thr-Arg-Arg-Glu-Ala-Glu-Asp-Pro-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-
5 Gln-Lys-Arg-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-
Glu-Asn-Tyr-Cys-Gly (SEQ ID NO: 3).

4. Verfahren zur chromatographischen Reinigung des gentechnologisch
hergestellten Preproinsulins der Formel 1, wobei das Preproinsulin folgende
10 Aminosäuresequenz hat:

Ala-Thr-Thr-Ser-Thr-Gly-Asn-Ser-Ala-Arg-Phe-Val-Lys-Gln-His-Leu-Cys-Gly-
Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-
Thr-Pro-Glu-Thr-Arg- Asp-Val-Pro-Gln-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-
15 Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-Lys-Arg-Gly-Ile-Val-Glu-
Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn (SEQ
ID NO: 4).

5. Verfahren gemäss den Ansprüchen 1 bis 4 zur Abtrennung von
20 Fremdsubstanzen aus den Lösungen von Preproinsulinen, welche die
Denaturierung von Insulin induzieren.

6. Verfahren gemäss den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die
zweite Chromatographie bei einem pH-Wert von 3,0 bis 5,5 durchgeführt wird.
25

7. Verfahren gemäss den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die
zweite Chromatographie bei einem Druck von 1 bis 30 bar durchgeführt wird.

8. Verfahren zur Herstellung von Insulin durch Expression ungefalteten
30 Preproinsulins, umfassend die Schritte:

a) Fermentation von gentechnisch veränderten Mikroorganismen, welche ungefaltetes
Preproinsulin exprimieren

- b) Ernten der Mikroorganismen und Zellaufschluß
- c) Isolierung der Einschlußkörper mit ungelöstem, ungefalteten Preproinsulin
- d) Auflösen des Preproinsulins mit korrekter Faltung der Peptidkette und mit gleichzeitiger Schließung der Disulfidbrücken zum Preproinsulin und
- 5 anschließendem Durchlaufen eines Verfahrens gemäß den Ansprüchen 1 - 7
- e) Enzymatische Spaltung des Preproinsulins zum Humaninsulin
- f) Reinigung des Humaninsulins
- g) Kristallisation des Humaninsulins und Trocknung

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Aventis Pharma Deutschland GmbH

<120>

<130>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:C-Peptid

<400> 1

Arg Asp Val Pro Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser
 1 5 10 15

Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg
 20 25

<210> 2

<211> 96

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Preproinsulin

I

<400> 2

Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Asn Gln His Leu
 1 5 10 15

Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg
 20 25 30

Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln
 35 40 45

Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln
 50 55 60

Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln
 65 70 75 80

Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 85 90 95

<210> 3

<211> 96

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Preproinsulin

II

<400> 3

Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Asn Gln His Leu
 1 5 10 15

Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg
 20 25 30

Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln
 35 40 45

Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln
 50 55 60

Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln
 65 70 75 80

Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly
 85 90 95

<210> 4

<211> 90

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Preproinsulin
III

<400> 4

Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Lys Gln His Leu
1 5 10 15

Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg
20 25 30

Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Glu Thr Arg Asp Val Pro Gln Val Glu Leu
35 40 45

Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly
50 55 60

Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys
65 70 75 80

Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
85 90

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 03/07820

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K14/62

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, BIOSIS, SEQUENCE SEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 33988 A (CHONG KUN DANG CORP ;KIM CHANG KYU (KR); KIM YONG IN (KR); OH SUNG) 8 July 1999 (1999-07-08) claim 1; examples 1-13 ---	1-8
A	US 5 101 013 A (DOERSCHUG MICHAEL ET AL) 31 March 1992 (1992-03-31) column 4, line 13 - line 56 ---	1-8
A	WO 91 03550 A (HOECHST AG ;GEN HOSPITAL CORP (US)) 21 March 1991 (1991-03-21) example 4 ---	1-8
A	WO 01 25278 A (AVENTIS PHARMA GMBH) 12 April 2001 (2001-04-12) page 3, line 9 - line 26 ---	1-8
	-/--	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 October 2003

Date of mailing of the international search report

03/11/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Steffen, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. ...

PCT/EP 03/07820

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>COWLEY D J ET AL: "Expression, purification and characterization of recombinant human proinsulin." FEBS LETTERS. NETHERLANDS 3 FEB 1997, vol. 402, no. 2-3, 3 February 1997 (1997-02-03), pages 124-130, XP002257683 ISSN: 0014-5793 page 125, right-hand column, paragraph 2 ---</p>	1-8
A	<p>LADISCH M R ET AL: "Recombinant human insulin." BIOTECHNOLOGY PROGRESS. UNITED STATES 1992 NOV-DEC, vol. 8, no. 6, November 1992 (1992-11), pages 469-478, XP001155556 ISSN: 8756-7938 the whole document -----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP03/07820

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date			
WO 9933988	A	08-07-1999	KR 253916 B1	01-05-2000			
			AU 735480 B2	12-07-2001			
			AU 1694199 A	19-07-1999			
			BR 9814526 A	17-10-2000			
			CA 2315750 A1	08-07-1999			
			CN 1290299 T	04-04-2001			
			EP 1042479 A1	11-10-2000			
			JP 2002500013 T	08-01-2002			
			WO 9933988 A1	08-07-1999			
			RU 2203949 C2	10-05-2003			
			US 5952461 A	14-09-1999			
			US 5101013	A	31-03-1992	DE 3726655 A1	23-02-1989
						AT 96447 T	15-11-1993
AU 609170 B2	26-04-1991						
AU 2059188 A	16-02-1989						
CA 1340237 C	15-12-1998						
DE 3885214 D1	02-12-1993						
DK 447688 A	12-02-1989						
EP 0305760 A2	08-03-1989						
ES 2047007 T3	16-02-1994						
FI 883708 A ,B,	12-02-1989						
HU 47958 A2	28-04-1989						
IE 61557 B1	16-11-1994						
IL 87385 A	18-08-1993						
JP 1086896 A	31-03-1989						
JP 2587867 B2	05-03-1997						
KR 129539 B1	04-04-1998						
NO 883554 A ,B,	13-02-1989						
NZ 225746 A	27-11-1990						
PH 26874 A	16-11-1992						
PT 88230 A ,B	30-06-1989						
ZA 8805871 A	26-04-1989						
WO 9103550	A	21-03-1991	AT 173018 T	15-11-1998			
			AU 638277 B2	24-06-1993			
			AU 6287290 A	08-04-1991			
			CA 2065146 A1	01-03-1991			
			DE 69032743 D1	10-12-1998			
			DE 69032743 T2	17-06-1999			
			DK 489780 T3	19-07-1999			
			EP 0489780 A1	17-06-1992			
			ES 2124216 T3	01-02-1999			
			GR 90100635 A	30-12-1991			
			HK 1012026 A1	28-04-2000			
			HU 60327 A2	28-08-1992			
			IE 903120 A1	13-03-1991			
			IL 95495 A	16-10-1996			
			JP 3043803 B2	22-05-2000			
			JP 5501799 T	08-04-1993			
			KR 159786 B1	16-11-1998			
			NO 920774 A	28-04-1992			
			PT 95111 A ,B	22-05-1991			
			US 5358857 A	25-10-1994			
WO 9103550 A1	21-03-1991						
US 5227293 A	13-07-1993						
ZA 9006839 A	26-06-1991						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No. . . .

PCT/EP 03/07820

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 0125278	A	12-04-2001	DE	19947456 A1		05-04-2001
			AU	7287700 A		10-05-2001
			BR	0014464 A		11-06-2002
			CA	2385857 A1		12-04-2001
			CN	1377370 T		30-10-2002
			WO	0125278 A1		12-04-2001
			EP	1222207 A1		17-07-2002
			HU	0202755 A2		28-12-2002
			JP	2003511018 T		25-03-2003
			NO	20021335 A		03-06-2002
			US	6534288 B1		18-03-2003
			ZA	200202520 A		25-10-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/07820

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07K14/62

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, BIOSIS, SEQUENCE SEARCH

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 99 33988 A (CHONG KUN DANG CORP ;KIM CHANG KYU (KR); KIM YONG IN (KR); OH SUNG) 8. Juli 1999 (1999-07-08) Anspruch 1; Beispiele 1-13 ---	1-8
A	US 5 101 013 A (DOERSCHUG MICHAEL ET AL) 31. März 1992 (1992-03-31) Spalte 4, Zeile 13 - Zeile 56 ---	1-8
A	WO 91 03550 A (HOECHST AG ;GEN HOSPITAL CORP (US)) 21. März 1991 (1991-03-21) Beispiel 4 ---	1-8
A	WO 01 25278 A (AVENTIS PHARMA GMBH) 12. April 2001 (2001-04-12) Seite 3, Zeile 9 - Zeile 26 ---	1-8
	-/--	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. Oktober 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

03/11/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Steffen, P

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>COWLEY D J ET AL: "Expression, purification and characterization of recombinant human proinsulin." FEBS LETTERS. NETHERLANDS 3 FEB 1997, Bd. 402, Nr. 2-3, 3. Februar 1997 (1997-02-03), Seiten 124-130, XP002257683 ISSN: 0014-5793 Seite 125, rechte Spalte, Absatz 2 -----</p>	1-8
A	<p>LADISCH M R ET AL: "Recombinant human insulin." BIOTECHNOLOGY PROGRESS. UNITED STATES 1992 NOV-DEC, Bd. 8, Nr. 6, November 1992 (1992-11), Seiten 469-478, XP001155556 ISSN: 8756-7938 das ganze Dokument -----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die für selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/07820

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung			
WO 9933988	A	08-07-1999	KR 253916 B1	01-05-2000			
			AU 735480 B2	12-07-2001			
			AU 1694199 A	19-07-1999			
			BR 9814526 A	17-10-2000			
			CA 2315750 A1	08-07-1999			
			CN 1290299 T	04-04-2001			
			EP 1042479 A1	11-10-2000			
			JP 2002500013 T	08-01-2002			
			WO 9933988 A1	08-07-1999			
			RU 2203949 C2	10-05-2003			
			US 5952461 A	14-09-1999			

			US 5101013	A	31-03-1992	DE 3726655 A1	23-02-1989
						AT 96447 T	15-11-1993
AU 609170 B2	26-04-1991						
AU 2059188 A	16-02-1989						
CA 1340237 C	15-12-1998						
DE 3885214 D1	02-12-1993						
DK 447688 A	12-02-1989						
EP 0305760 A2	08-03-1989						
ES 2047007 T3	16-02-1994						
FI 883708 A ,B,	12-02-1989						
HU 47958 A2	28-04-1989						
IE 61557 B1	16-11-1994						
IL 87385 A	18-08-1993						
JP 1086896 A	31-03-1989						
JP 2587867 B2	05-03-1997						
KR 129539 B1	04-04-1998						
NO 883554 A ,B,	13-02-1989						
NZ 225746 A	27-11-1990						
PH 26874 A	16-11-1992						
PT 88230 A ,B	30-06-1989						
ZA 8805871 A	26-04-1989						

WO 9103550	A	21-03-1991	AT 173018 T	15-11-1998			
			AU 638277 B2	24-06-1993			
			AU 6287290 A	08-04-1991			
			CA 2065146 A1	01-03-1991			
			DE 69032743 D1	10-12-1998			
			DE 69032743 T2	17-06-1999			
			DK 489780 T3	19-07-1999			
			EP 0489780 A1	17-06-1992			
			ES 2124216 T3	01-02-1999			
			GR 90100635 A	30-12-1991			
			HK 1012026 A1	28-04-2000			
			HU 60327 A2	28-08-1992			
			IE 903120 A1	13-03-1991			
			IL 95495 A	16-10-1996			
			JP 3043803 B2	22-05-2000			
			JP 5501799 T	08-04-1993			
			KR 159786 B1	16-11-1998			
			NO 920774 A	28-04-1992			
			PT 95111 A ,B	22-05-1991			
			US 5358857 A	25-10-1994			
			WO 9103550 A1	21-03-1991			
US 5227293 A	13-07-1993						
ZA 9006839 A	26-06-1991						

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Aktenzeichen

PCT/EP/03/07820

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0125278 A	12-04-2001	DE 19947456 A1	05-04-2001
		AU 7287700 A	10-05-2001
		BR 0014464 A	11-06-2002
		CA 2385857 A1	12-04-2001
		CN 1377370 T	30-10-2002
		WO 0125278 A1	12-04-2001
		EP 1222207 A1	17-07-2002
		HU 0202755 A2	28-12-2002
		JP 2003511018 T	25-03-2003
		NO 20021335 A	03-06-2002
		US 6534288 B1	18-03-2003
		ZA 200202520 A	25-10-2002
