



(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 147437 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: 0540/81

(22) Indleveringsdag: 09 feb 1981

(41) Alm. tilgængelig: 12 aug 1981

(44) Fremlagt: 06 aug 1984

(86) International ansøgning nr.: —

(30) Prioritet: 11 feb 1980 DK 574/80

(51) Int.Cl.³: C 12 P 21/02
// C 07 C 103/52

(71) Ansøger: *NOVO INDUSTRI A/S; Novo Alle, 2880 Bagsværd, DK.

(72) Opfinder: Jan *Markussen; DK.

(74) Fuldmægtig: —

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af humaninsulin
eller threoninB30estere af humaninsulin eller et
salt eller kompleks deraf

(57) Sammen drag:

540-81

Fremstilling af humaninsulin eller threonin^{B30}estere af humaninsulin eller et salt eller kompleks deraf ved at en insulinforbindelse indeholdende human-des(Thr^{B30}) insulin delen eller et salt eller kompleks deraf, som kan omdannes dertil, transpeptideres med en L-threoninester eller et salt deraf i en blanding af vand, et vandblandbart, organisk opløsningsmiddel og trypsin eller et aktivt tryptinderivat, hvorhos indholdet af vand i reaktionsblandingen er under 50% (rumfang/rumfang), og reaktionstemperaturen er under 50° C og eventuelt i nærværelse af en syre, hvorefter den resulterende threonin^{B30}ester af humaninsulin om nødvendigt spaltes.

DK 147437 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af humaninsulin eller threonin^{B30} estere af humaninsulin eller et salt eller kompleks deraf.

5 Til behandlingen af diabetes mellitus er der sædvanligvis anvendt insulinpræparater indeholdende svine- eller okseinsulin. Okse-, svine- og humaninsulin udviser mindre forskelle med hensyn til deres aminosyresammensætning, idet forskellen mellem human- og svineinsulin er begrænset til en enkelt aminosyre, idet B30-aminosyren i humaninsulin
10 er threonin, hvorimod den i svineinsulin er alanin. Man kan imidlertid hævde, at det ideelle insulinpræparat til behandling af mennesker er insulin, som har nøjagtig samme kemiske struktur som humaninsulin.

Den nødvendige mængde humanpankreas-kirtler til
15 fremstilling af naturligt humaninsulin er ikke tilgængelig.

Syntetisk humaninsulin er fremstillet i lille skala med store omkostninger, jfr. Helv.Chim.Acta 57, 2617, og 60, 27. Semisyntetisk humaninsulin er fremstillet ud fra svineinsulin ad langsommelige veje, jfr. Hoppe-Seyler's
20 Z.Physiol.Chem. 357, 759.

USA-patentskrift nr. 3.276.961 påstås at angå en fremgangsmåde til fremstilling af semisyntetisk humaninsulin, hvor andre, animalske insuliner omsættes med threonin i nærværelse af et enzym såsom trypsin eller carboxypeptidase
25 A. Udbyttet af humaninsulin er imidlertid yderst ringe (hvis der i det hele taget er noget udbytte), idet fremgangsmåden udføres i vand, under hvilke betingelser trypsin medfører spaltning af Arg^{B22}-Gly^{B23}-bindingen, jfr. J.Biol.Chem. 236, 743.

30 En anden, kendt semisyntetisk fremgangsmåde til fremstilling af humaninsulin omfatter følgende tre trin: I første trin spaltes svineinsulin til svine-des-(Ala^{B30})-insulin ved behandling med carboxypeptidase A, jfr. Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 359, 799. I andet trin underkastes
35 svine-des-(Ala^{B30})-insulin en trypsinkatalyseret kobling med Thr-OBu^t, hvorved der dannes Thr^{B30}-tert.butylester af humaninsulin. I tredje trin behandles den pågældende ester

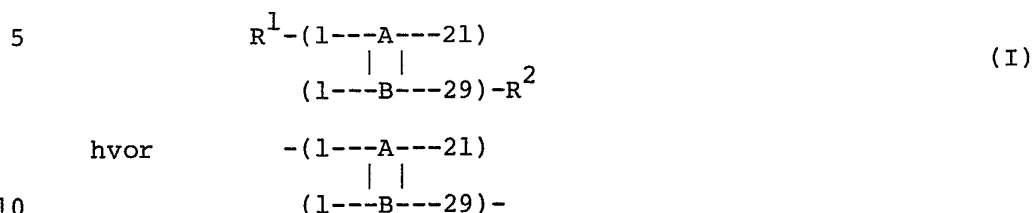
med trifluoreddikesyre, hvorved fås humaninsulin, jfr. Nature 280, 412. Det første trin resulterer imidlertid i en delvis fjernelse af Asn^{A21}, hvorved fås des-(Ala^{B30},Asn^{A21})-insulin. Dette derivat giver efter de to efterfølgende trin anledning til forurening med des-(Asn^{A21})-insulin i det fremstillede semisyntetiske humaninsulin, hvilket er en forurening, som ikke let kan fjernes med kendte præparative metoder. Des-(Asn^{A21})-insulin udviser lav biologisk aktivitet (ca. 5%), jfr. Amer.J.Med. 40, 750.

10 Det har nu overraskende vist sig, at insulinforbindelser, som er forskellige fra humaninsulin, f.eks. svininsulin og visse urenheder deri, kan omdannes til humaninsulin ved en fremgangsmåde, ved hvilken insulinforbindelserne i ét trin omdannes direkte til en threonin^{B30} ester af humaninsulin. Denne fremgangsmåde giver humaninsulin i væsentligt større udbytte end ved de kendte fremgangsmåder og uden biprodukter, som det er vanskeligt at fjerne.

15 Den foreliggende opfindelse bygger på den opdagelse, at aminosyren eller peptidkæden, som er bundet til carbonylgruppen, Lys^{B29}, i insulinforbindelsen med den almene formel I i krav 1, i ét trin kan udskiftes med en threoninester. Den pågældende udskiftning betegnes her en transpeptidering.

20 Insulinforbindelser med formlen I er insuliner og insulinlignende forbindelser indeholdende human-des(Thr^{B30})-insulindelen, i hvilke B30-aminosyren i insulinet er alanin (i insulin fra f.eks. svin, hund, finhval og spermacethval) eller serin (kanin). Den heri anvendte betegnelse "insulinlignende forbindelser" omfatter proinsulin stammende fra en hvilken som helst af ovennævnte arter og primater samt mellemprodukter fra omdannelsen af proinsulin til insulin. Som eksempler på sådanne mellemprodukter kan angives splitproinsulin, desdipeptidproinsuliner, desnonapeptidproinsulin og diarginininsuliner, jfr. R. Chance: In Proceedings of the
30 Seventh Congress of IDF, Buenos Aires 1970, 292 - 305, Editors: R.R. Rodrigues & J.V.-Owen, Excerpta Medica, Amsterdam.

Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse er ejendommelig ved at en insulinforbindelse med den almene formel I og forskellig fra humaninsulin eller flere forbindelser med den almene formel I



betegner human-des(Thr^{B30})insulindelen, hvori Gly^{A1} er forbundet med substituenten betegnet R¹, og Lys^{B29} er forbundet med substituenten betegnet R², R² betegner en aminosyre eller en peptidkæde indeholdende højst 36 aminosyrer, og R¹ betegner hydrogen eller en gruppe med den almene formel R³-X-, hvor X betegner arginin eller lysin, og R³ betegner en peptidkæde indeholdende højst 35 aminosyrer, eller R² sammen med R³ betegner en peptidkæde indeholdende højst 35 aminosyrer, med det forbehold, at antallet af aminosyrer, som er til stede i R¹ og R², er mindre end 37, eller et salt eller kompleks deraf, som kan omdannes dertil, transpeptideres med en L-threoninester med den almene formel II



hvor R⁴ betegner en carboxylbeskyttelsesgruppe, og R⁵ betegner hydrogen eller en hydroxylbeskyttelsesgruppe, eller et salt deraf i en blanding af vand, et vandblandbart, organisk opløsningsmiddel og trypsin, hvorhos indholdet af vand i reaktionsblandingen er under 50% (rumfang/rumfang), og reaktionstemperaturen er under 50°C, og der eventuelt er en syre til stede, hvorefter den resulterende threonin^{B30} ester af humaninsulin om ønsket spaltes.

Selv om trypsin er bedst kendt for sine proteolytiske egenskaber, har fagfolk som nævnt fundet ud af, at trypsin er i stand til at katalysere koblingen af des-(Ala^{B30})-insulin og en threonin-tert.butylester, jfr. Nature

280, 412. Ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse anvendes trypsin imidlertid til at katalysere en transpeptidering.

5 Ifølge ovenstående angår Nature 280, 412, en metode til peptidkobling, hvorimod den foreliggende opfindelse angår en metode til transpeptidering af peptider. Hvis man ser bort fra det trin, hvor humaninsulinesteren hydrolyseres, skal der ifølge Nature 280, 412, anvendes to trin til fremstilling af humaninsulinesteren, nemlig et peptidspaltningstrin og et peptidkoblingstrin. Ved fremgangsmåden ifølge
10 den foreliggende opfindelse fås humaninsulinesteren direkte i ét trin, nemlig et transpeptideringstrin.

I Nature 280, 412, anføres det, at det er overraskende, at der ikke sker nogen spaltning af Arg^{B22}-Gly^{B23}-bindingen i produktet. Det er kendt, at trypsin i vandigt
15 medium spalter ved både Arg^{B22}-Gly^{B23} og ved Lys^{B29}-Ala^{B30}, og man må følgelig på basis af Nature 280, 412, forvente, at trypsin i det organiske medium heller ikke spalter Lys^{B29}-Ala^{B30}-bindingen. I Nature 280, 412, angives intet om, hvorvidt der kan ske en spaltning af Lys^{B29}-Ala^{B30}-bindingen i
20 det organiske medium. Det er følgelig særdeles overraskende, at man direkte på svineinsulin kan foretage transpeptideringen ifølge den foreliggende opfindelse.

I Biochem.Biophys.Res.Com. 92, 396, er beskrevet
25 en metode til fremstilling af humaninsulin, hvilken metode stort set er identisk med den i Nature 280, 412, beskrevet, idet der dog som enzym anvendes Achromobacter lyticus-protease. Ovennævnte betragtninger vedrørende Nature 280, 412, er følgelig analogt gældende for Biochem.Biophys.Res.Com. 92,
30 396.

Transpeptideringen ifølge den foreliggende opfindelse kan udføres ved at opløse insulinforbindelsen, en L-threoninester og trypsin i en blanding af vand og mindst
35 ét vandblandbart, organisk opløsningsmiddel, eventuelt i nærværelse af en syre.

Foretrukne vandblandbare, organiske opløsningsmidler er polære opløsningsmidler. Som specifikke eksempler på sådanne opløsningsmidler kan angives methanol, ethanol, 2-propanol, 1,2-ethandiol, acetone, dioxan, tetrahydrofuran, N,N-dimethylformamid, formamid, N,N-dimethylacetamid, N-methylpyrrolidon, hexamethylphosphortriamid og acetonitril.

Afhængigt af det anvendte, vandblandbare, organiske opløsningsmiddel, af den valgte reaktionstemperatur og af tilstedeværelsen af en syre i reaktionsblandingen er indholdet af vand i reaktionsblandingen fortrinsvis mellem 43 og 10% (rumfang/rumfang). Ved en foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse er indholdet af vand i reaktionsblandingen mellem 43 og 10% (rumfang/rumfang), idet der herved fås et produkt med et relativt lavt indhold af urenheder.

En fordel ved at formindske mængden af vand i reaktionsblandingen er, at derved formindskes dannelsen af biprodukter. Ved at forøge mængden af syre i reaktionsblandingen er det på tilsvarende måde muligt at formindske dannelsen af biprodukt. Forøgelsen i udbytte er positivt korreleret med en høj procentsats af organisk opløsningsmiddel.

Ved udøvelse af den foreliggende opfindelse er det ikke væsentligt, hvilken art trypsin der anvendes. Trypsin er et godt karakteriseret enzym, der kommercielt er tilgængeligt i høj renhed, især fra okse- og svinekilder. Der kan endvidere anvendes trypsin af mikrobiel oprindelse. Ved udøvelse af denne opfindelse er trypsinformen, f.eks. krySTALLINSK trypsin (opløselig form), immobiliseret trypsin eller endog trypsinderivater (så længe trypsinaktiviteten bibeholdes), endvidere ikke væsentlig. Den heri anvendte betegnelse trypsin skal omfatte trypsiner af enhver oprindelse og alle trypsinforme, som har bibeholdt den transpeptiderende aktivitet, herunder proteaser med trypsinlignende specificitet, f.eks. *Achromobacter lyticus*-protease, jfr. Agric.Biol.Chem. 42, 1443.

Som eksempler på aktive trypsinderivater kan angives acetyleret trypsin, succinyleret trypsin, glutaraldehyd-behandlet trypsin og immobiliserede trypsinderivater.

5 Såfremt der anvendes et immobiliseret trypsin, suspenderes det i mediet.

Til opnåelse af et egent puffersystem kan der tilsættes organiske eller uorganiske syrer såsom saltsyre, myresyre, eddikesyre, propionsyre og smørsyre og baser såsom pyridin, TRIS, N-methylmorpholin og N-ethylmorpholin. Orga-
10 niske syrer foretrækkes. Omsætningen kan imidlertid udføres uden sådanne tilsætninger. Den tilsatte mængde syre er sædvanligvis mindre end ca. 10 ækvivalenter pr. ækvivalent L-threoninester. Mængden af syre er fortrinsvis mellem 0,5 og 5 ækvivalenter pr. ækvivalent L-threoninester. En fore-
15 trukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse går ud på, at koncentrationen af L-threoninester i reaktionsblandingen overstiger 0,1 molær, og at reaktionsblandingen indeholder fra 0 til 10 ækvivalenter af en syre pr. ækvivalent L-threoninester.

20 Der kan tilsættes ioner, som stabiliserer trypsin, såsom kalciumioner.

Til opnåelse af en tilstrækkelig reaktionshastighed udføres enzymatiske reaktioner med trypsin sædvanligvis ved ca. 37°C. Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfin-
25 delse kan udføres ved en temperatur i området mellem 50°C og reaktionsblandingsens frysepunkt. For at undgå inaktivering af trypsin er det imidlertid fordelagtigt at udføre fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse ved en temperatur under stuetemperatur. I praksis foretrækkes reaktions-
30 temperaturer over ca. 0°C. En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse går følgende ud på, at reaktionstemperaturen er under 37°C, fortrinsvis under stuetemperatur, og over 0°C.

Afhængigt af reaktionstemperaturen, af den tilsat-
35 te mængde trypsin og af andre reaktionsbetingelser er reaktionstiden sædvanligvis mellem flere timer og flere dage.

Vægtforholdet mellem trypsin og insulinforbindelsen i reaktionsblandingen er sædvanligvis over ca. 1:200, fortrinsvis over ca. 1:50, og under ca. 1:1.

De threonin^{B30}estere af humaninsulin, der fås ved
5 transpeptideringen, kan angives ved den almene formel III



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

Anvendelige L-threoninestere med formel II er så-
10 danne, i hvilke R⁴ er en carboxylbeskyttelsesgruppe, der kan fjernes fra threonin^{B30}esteren af humaninsulin (formel III) under betingelser, der ikke medfører væsentlig, irreversibel ændring i insulinmolekylet. Som eksempler på sådanne carboxylbeskyttelsesgrupper kan angives lavere alkyl, f.eks.
15 methyl, ethyl og tert.butyl, substitueret benzyl såsom p-methoxybenzyl og 2,4,6-trimethylbenzyl og diphenylmethyl, og grupper med den almene formel -CH₂CH₂SO₂R⁶, hvor R⁶ betegner lavere alkyl såsom methyl, ethyl, propyl og n-butyl. Egnede hydroxylbeskyttelsesgrupper R⁵ er sådanne, der kan fjernes
20 fra threonin^{B30}esteren af humaninsulin (formel III) under betingelser, der ikke medfører væsentlig, irreversibel ændring i insulinmolekylet. Som et eksempel på en sådan gruppe (R⁵) kan angives tert.butyl.

Lavere alkylgrupper indeholder mindre end 7 carbonatomer, fortrinsvis mindre end 5 carbonatomer.
25

Yderligere, sædvanligt anvendte beskyttelsesgrupper er beskrevet af Wunsch: Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl), Vol. XV/1, editor: Eugen Müller, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974.

30 Nogle L-threoninestere (formel II) er kendte forbindelser, og de resterende L-threoninestere (formel II) kan fremstilles analogt med fremstillingen af kendte forbindelser.

L-threoninesterne med formel II kan være de frie baser eller egnede organiske eller uorganiske salte deraf, fortrinsvis acetater, propionater, butyrater og hydrohalogenider såsom hydrochlorider.

5 Det er ønskeligt at anvende reaktanterne, dvs. insulinforbindelsen og L-threoninesteren (formel II), i høje koncentrationer. Det molære forhold mellem L-threoninesteren og insulinforbindelsen er fortrinsvis over ca. 5:1.

10 Det er ønskeligt, at koncentrationen af L-threoninesteren (formel II) i reaktionsblandingen overstiger 0,1 molær.

Humaninsulin kan fås ud fra threonin^{B30} estere af humaninsulin (formel III) ved fjernelse af beskyttelsesgruppen R^4 og en eventuelt tilstedeværende beskyttelsesgruppe R^5 på kendt måde eller på i og for sig kendt måde. Såfremt R^4 er methyl, ethyl eller en gruppe med formlen $-CH_2CH_2SO_2R^6$, hvor R^6 har ovennævnte betydning, kan den pågældende beskyttelsesgruppe fjernes under milde, basiske betingelser i et vandigt medium, fortrinsvis ved en pH-værdi på mellem ca. 8 og ca. 12, f.eks. ved ca. 9,5. Som basen kan anvendes ammoniak, triethylamin eller hydroxyder af alkalimetaller såsom natriumhydroxyd. Såfremt R^4 er tert.butyl, substitueret benzyl såsom p-methoxybenzyl eller 2,4,6-trimethylbenzyl eller diphenylmethyl, kan den pågældende gruppe fjernes ved acidolyse, fortrinsvis med trifluoreddikesyre. Trifluoreddikesyren kan være ikke-vandig eller kan indeholde noget vand, eller den kan være fortyndet med et organisk opløsningsmiddel såsom dichlormethan. Såfremt R^5 er tert.butyl, kan den pågældende gruppe fjernes ved acidolyse, jfr. ovenfor.

30 Foretrukne threonin^{B30} estere af humaninsulin med formel III er forbindelser, hvor R^5 er hydrogen, og disse kan fremstilles ud fra L-threoninesterne med formel II, hvor R^5 er hydrogen.

Ved transpeptideringen ifølge den foreliggende opfindelse omdannes en hvilken som helst af ovennævnte insulinforbindelser således til threonin^{B30} estere af humaninsulin (formel III), som derefter kan spaltes til dannelsen af humaninsulin.

En yderligere fordel ved den foreliggende opfindelse er det forhold, at insulinlignende forbindelser, som er til stede i rått insulin og i nogle kommercielle insulinpræparater, og som er dækket af formel I, ved transpeptideringen ifølge den foreliggende opfindelse omdannes til threonin^{B30} estere af humaninsulin, hvilke forbindelser derefter kan spaltes under dannelsen af humaninsulin. Eksempler på insulinlignende forbindelser med formel I fremgår af det følgende:

15 Svinediarginininsulin (R^1 er hydrogen, og R^2 er -Ala-Arg-Arg), svineproinsulin (R^2 er sammen med R^3 -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^2 er sammen med R^3 -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}), svinesplitproinsulin (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, og R^3 er Ala-Leu-Glu-Gly-Pro-Pro-Gln-Lys-), 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^2 er sammen med R^3 -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 threonyl er knyttet til Lys^{B29}) og abeproinsulin (R^2 er sammen med R^3 -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-, hvor den terminale threonyl er knyttet til Lys^{B29}).

I alle disse urenheder, der er dækket af formel I, udskiftes R^1 -substituenten betegnet R^3-X - således med hydrogen.

Idet svineinsulin er relativt let tilgængeligt, anvendes der som udgangsmateriale ved en foretrukken udførelsesform for opfindelsen svineinsulin. En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse går ud på at omsætte rått svineinsulin indeholdende insulinlignende forbindelser eller et salt eller kompleks deraf med en L-threoninester (formel II) eller et salt deraf under ovennævnte betingelser, hvorefter beskyttelsesgruppen R^4 og en eventuelt tilstedeværende beskyttelsesgruppe R^5 fjernes. Ved denne metode omdannes svineinsulin samt insulinlignende forbindelser deri til humaninsulin.

Som eksempler på et kompleks eller et salt af en insulinforbindelse (formel I) kan angives et zinkkompleks eller zinksalt.

Når reaktionsbetingelserne vælges ifølge ovenstående forklaring og under hensyntagen til de resultater, der er opnået i de følgende eksempler, er det muligt at få et udbytte af threonin^{B30} ester af humaninsulin, der er over 60% og endog over 80% og under visse foretrukne betingelser over 90%. Ved en foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse er indholdet af vand i reaktionsblandingen mellem 43 og 20% (rumfang/rumfang). En yderligere foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse går ud på, at insulinforbindelsen er svineinsulin, at L-threoninesteren er Thr-OMe eller Thr-OBu^t, at det vandblandbare, organiske opløsningsmiddel er N,N-dimethylformamid eller N,N-dimethylacetamid, at reaktionstemperaturen er ca. 37°C, at indholdet af vand i reaktionsblandingen er mellem 41 og 43%, at vægtforholdet mellem trypsin og insulinforbindelsen er ca. 1:8, at molforholdet mellem L-threoninesteren og insulinforbindelsen er ca. 120:1, og at der er tilsat mellem 1,2 og 1,5 ækvivalenter eddikesyre pr. ækvivalent L-threoninester.

Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse har derfor følgende fordele i sammenligning med den kendte teknik:

- a) Den enzymatiske hydrolyse til fjernelse af Ala^{B30}, f.eks. med carboxypeptidase A, er udeladt.
- b) Isoleringen af et mellemprodukt såsom svinedes-(Ala^{B30})-insulin er unødvendig.
- c) Forurening med des(Asn^{A21})-insulinderivater undgås.
- d) Proinsulin og andre insulinlignende urenheder, som er til stede i rått svineinsulin, omdannes ved fremgangsmåden ifølge denne opfindelse - via threonin^{B30} esteren af humaninsulin - til humaninsulin, hvorved udbyttet forøges.
- e) Antigene insulinlignende forbindelser, jfr. britisk patentskrift nr. 1.285.023, omdannes til humaninsulin.

En foretrukken fremgangsmåde til fremstilling af humaninsulin er følgende:

- 1) Det til transpeptideringen anvendte udgangsmateriale er rått svineinsulin, f.eks. krystallinsk insulin, der er fremstillet under anvendelse af en citratpuffer, jfr. USA-patentskrift nr. 2.626.228.
- 2) Hvis der er trypsinaktivitet tilbage efter transpeptideringen, foretrækkes det at fjerne det, f.eks. under betingelser, ved hvilke trypsin er inaktivt, f.eks. i surt medium ved en pH-værdi på under 3. Trypsin kan fjernes ved separation efter molekylvægt, f.eks. ved gelfiltrering på "Sephadex G-50" eller "Bio-gel P-30" i 1 M eddikesyre, jfr. Nature 280, 412.
- 3) Andre urenheder såsom uomsat svineinsulin kan fjernes under anvendelse af anion- og/eller kationbytterchromatografering, jfr. nedenstående eksempler 1 og 2.
- 4) Derefter spaltes threonin^{B30} esteren af humaninsulin, og humaninsulin isoleres, f.eks. krystalliseres, på i og for sig kendt måde.

På denne måde kan der fås humaninsulin med en acceptabel farmaceutisk renhed, og humaninsulinet kan ønskes renses yderligere.

Anvendte forkortelser er i overensstemmelse med de
5 regler, der blev godkendt (1974) af IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, jfr. Collected Tentative Rules & Recommendations of the Commission on Biochemical Nomenclature IUPAC-IUB, 2nd ed., Maryland 1975. Nærmere præciseret er betydningen af de heri anvendte forkortelser følgende:
10 Ala er alanin, Arg er arginin, Asn er asparagin, Asp er asparaginsyre, Gln er glutamin, Glu er glutaminsyre, Gly er glycin, Leu er leucin, Lys er lysin, Pro er prolin, Ser er serin, Thr er threonin, og Val er valin. Bu^t er tert.butyl, og Me er methyl.

15 Sephadex og Bio-gel er varemærker.

Analytiske undersøgelser:

Omdannelsen af svineinsulin og svineproinsulin til humaninsulinestere kan anskueliggøres ved DISC-PAGE-elektroforese i 7,5%'s polyacrylamidgel i en puffer bestående af
20 0,375 M TRIS, 0,06 M HCl og 8 M urinstof. Pufferens pH-værdi er 8,7. Estere med formel III vandrer med en hastighed, der er 75% af svineinsulins hastighed. Svineproinsulin, som vandrer med 55% af svineinsulins hastighed, omdannes ved fremgangsmåden ifølge denne opfindelse til det samme produkt.
25 Identifikationen af omdannelsesproduktet som forbindelser med formel III skyldes følgende kriterier:

- a) Den elektroforetiske vandring af humaninsulinestere med formel III i forhold til svineinsulin svarer til tabet af én negativ ladning.
- 30 b) Aminosyresammensætningen af de farvede proteinbånd i gelen repræsenterende forbindelser med formel III er identisk med humaninsulins aminosyresammensætning, dvs. 3 mol threonin og 1 mol alanin pr. mol insulin, og sammensæt-

ningen af svineinsulin er 2 mol threonin og 2 mol alanin pr. mol insulin. Teknikken til analysering af aminosyresammensætninger af proteinbånd i polyacrylamidgeler er beskrevet i Eur.J.Biochem. 25, 147.

- 5 c) Beviset for, at det inkorporerede threonin er placeret som C-terminal aminosyre i B-kæden, kan fås ved oxidativ sulfitolyse af S-S-broerne i insulin i 6 M guanidinhydrochlorid efterfulgt af adskillelse af A- og B-kæder ved ionbytterchromatografering på "SP Sephadex". Ved fordøjelse af B-kæde-S-sulfonatet med carboxypeptidase A frigøres kun den C-terminale aminosyre. Teknikken er beskrevet af Markussen i Proceedings of the Symposium on Proinsulin, Insulin and C-peptide, Tokushima, 12 - 14 juli, 1978 (udgiver: Baba, Kaneko og Yaniahara) Int.Congress Series No. 468, Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford. Analysen udføres efter, at estergruppen er spaltet fra forbindelser med formel III.
- 10
- 15

De 3 analyser beviser klart, at der er sket omdannelse til humaninsulin.

- Omdannelsen af svineinsulin og svineproinsulin til humaninsulinestere kan følges kvantitativt ved HPLC (high pressure liquid chromatography) på omvendt fase. Der anvendes en 4 x 300 mm "μBondapak C₁₈-kolonne" (Waters Ass.), og elueringen udføres med en puffer indeholdende 0,2 M ammoniumsulfat (som er indstillet på en pH-værdi på 3,5 med svovlsyre) og indeholdende 26 - 50% acetonitril. Den optimale acetonitrilkoncentration afhænger af, hvilken ester med formel III man ønsker at separere fra svineinsulin. Såfremt R⁴ er methyl, og R⁵ er hydrogen, opnås separation i 26% (rumfang/rumfang) acetonitril. Svineinsulin og (Thr-OMe)^{B30}-h-In (Me er methyl) eluerer efter henholdsvis 4,5 og 5,9 kolonnerumfang som klart separerede symmetriske toppe. Før påføringen på HPLC-kolonnen udfældes proteinerne i reaktionsblandingen ved tilsætning af 10 rumfang acetone. Bundfaldet opsamles ved centrifugering, tørres i vakuum og opløses i 0,02 M svovlsyre.
- 20
- 25
- 30
- 35

Fremgangsmåden til fremstilling af humaninsulinestere og humaninsulin belyses nærmere ved følgende eksempler, som illustrerer nogle foretrukne udførelsesformer for fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

5 μ Bondapak er et varemærke.

Eksempel 1

200 g rå svineinsulin, som er krystalliseret én gang, opløses i 1,8 ml 3,33 M eddikesyre. Der tilsættes 2 ml af en 2 M opløsning af Thr-OMe (Me er methyl) i N,N-dimethylacetamid og 20 mg trypsin opløst i 0,2 ml vand. Efter henstand i 10 18 timer ved 37°C udfældes proteinerne ved tilsætning af 40 ml acetone, og bundfaldet isoleres ved centrifugering. Supernatanten kasseres. Analyse af bundfaldet ved HPLC under anvendelse af 26% acetonitril (jfr. Analytiske undersøgelser) viser en 60%'s omdannelse af svineinsulin til (Thr-OMe)^{B30}-h-In. Bundfaldet opløses i 8 ml friskt afioniseret 8 M urinstof, pH-værdien indstilles på 8,0 med 1 M ammoniak, opløsningen føres på en 2,5 x 25 cm kolonne, som er fyldt med "QAE A-25 Sephadex", der er equilibreret med en 0,1 M ammoniumchloridpuffer, som indeholder 60% (rumfang/rumfang) ethanol, og pH-værdien deraf indstilles på 8,0 med ammoniak. Elueringen udføres med den samme puffer, og der opsamles fraktioner på 15 ml. (Thr-OMe)^{B30}-h-In findes i fraktionerne nr. 26 - 46, og ikke-omsat svineinsulin i fraktionerne nr. 90 - 120. 25 Fraktionerne nr. 26 - 46 forenes, ethanolet afdampes i vakuum, og (Thr-OMe)^{B30}-h-In krystalliseres i citratpuffer som beskrevet af Schlichtkrull et al., Handbuch der inneren Medizin, 7/2A, 96, Berlin, Heidelberg, New York 1975. Udbyttet er 95 mg krystaller med samme rombiske form som svineinsulin, der er krystalliseret på analog måde. 30 Aminosyresammensætningen viser sig at være identisk med humaninsulins aminosyresammensætning. Yderligere analytiske undersøgelser, der

er beskrevet i ovenstående afsnit: "Analytiske undersøgelser", viser, at det resulterende produkt er (Thr-OMe)^{B30}-h-In.

Eksempel 2

5 100 mg svineinsulin, som opfylder de renhedskriterier, der er angivet i britisk patentskrift nr. 1.285.023, opløses i 0,9 ml 3,33 M eddikesyre, og der tilsættes derefter 1 ml af en 2 M opløsning af threoninmethylester i N,N-dimethylformamid og 12 mg TPCK-behandlet (TPCK er tosyl-
10 phenylalaninchlormethylketon) trypsin, som er opløst i 0,1 ml vand. Efter inkubering i 24 timer ved 37°C standses reaktionen ved tilsætning af 4 ml 1 M fosforsyre. Den vundne (Thr-OMe)^{B30}-h-In separeres fra ikke-omsat svineinsulin ved ionbytterchromatografering på en 2,5 x 25 cm's kolonne af "SP
15 Sephadex" med en eluent indeholdende 0,09 M natriumchlorid og 0,02 M natriumdihydrogenfosfat (pH-værdi af puffer: 5,5) i 60% ethanol. Fraktioner indeholdende (Thr-OMe)^{B30}-h-In opsamles, ethanolet fjernes i vakuum, og produktet krystalliseres på analog måde som beskrevet i eksempel 1. Udbyttet er 50 mg
20 (Thr-OMe)^{B30}-h-In.

Eksempel 3

100 mg svineproinsulin opløses i 0,9 ml 3,33 M eddikesyre og omdannes til (Thr-OMe)^{B30}-h-In og renses på analog måde som beskrevet for svineinsulin i eksempel 1. Omdannelsen
25 af proinsulin til (Thr-OMe)^{B30}-h-In viser sig at være 73% ved HPLC-analyse af acetonebundfaldet. Udbyttet af krystallinsk (Thr-OMe)^{B30}-h-In er 54 mg.

Eksempel 4

100 mg svineinsulin opløses i 0,9 ml 2,77 M eddike-
syre i vand og omsættes på analog måde som beskrevet i eksem-
pel 2. Efter afslutning af omsætningen udfældes proteinerne
5 ved tilsætning af 10 rumfang acetone. Analyse ved DISC PAGE
viser en omdannelse til (Thr-OMe)^{B30}-h-In på 70%.

Eksempel 5

100 mg svineinsulin opløses i 0,9 ml 3,33 M eddike-
syre, og der tilsættes 1 ml 2 M Thr-OMe i N-methylpyrrolidon.
10 Omsætningen udføres på analog måde som beskrevet i eksempel
4, og omdannelsen til (Thr-OMe)^{B30}-h-In er 20%.

Eksempel 6

100 mg svineinsulin opløses i 0,9 ml 2,77 M eddike-
syre i vand, og der tilsættes 1 ml 2 M Thr-OMe i HMPA (hexa-
15 methylfosfortriamid). Omsætningen udføres på analog måde som
beskrevet i eksempel 4. Omdannelsen til (Thr-OMe)^{B30}-h-In er
80%.

Eksempel 7

100 mg svineinsulin opløses i 0,9 ml 3,33 M eddike-
20 syre, og der tilsættes 1 ml 2 M Thr-OMe i N,N-dimethylaceta-
mid. Omsætningen udføres på analog måde som beskrevet i
eksempel 4. Omdannelsen til (Thr-OMe)^{B30}-h-In er 80%.

Eksempel 8

100 mg svineinsulin opløses i 0,9 ml 3,33 M eddike-
25 syre, og der tilsættes 1 ml 2 M Thr-OMe i N,N-dimethylaceta-
mid. Derefter tilsættes 200 U (units = enheder) trypsinakti-
vitet (bestemt med substratet BAEE) immobiliseret på 1 g
glasperler, og efter inkubering ved 37°C i 24 timer frafil-

treres det til glasset bundne trypsin. Efter afslutning af omsætningen udfældes proteinerne ved tilsætning af 10 rumfang acetone. Analyse ved DISC PAGE viser en omdannelse til (Thr-OMe)^{B30}-h-In på 40%.

5 Eksempel 9

100 mg svineinsulin opløses i 0,9 ml 3,33 M eddikesyre, og der tilsættes 1 ml 2 M Thr-OMe i N,N-dimethylacetamid. Derefter tilsættes 300 U trypsin aktivitet (målt med substratet BAEE), der er immobiliseret på 200 mg CNBr-aktiveret "Sephadex G-150". Efter incubering ved 37°C i 24 timer
10 fracfiltreres det til "Sephadex" bundne trypsin. Efter afslutning af omsætningen udfældes proteinerne ved tilsætning af 10 rumfang acetone. Analyse ved DISC PAGE viser en omdannelse til (Thr-OMe)^{B30}-h-In på 70%.

15 Eksempel 10

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

20 Eksempel 11

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

Eksempel 12

25 Den i eksempel 9 angivne fremgangsmåde gentages med det forbehold, at den anvendte ester er 2 M Thr-OBu^t i N,N-dimethylacetamid. Omdannelsen til (Thr-OBu^t)^{B30}-h-In er 70%.

Eksempel 13

100 mg svineproinsulin opløses i 0,9 ml 3,33 M eddi-
kesyre, og der tilsættes 1 ml 2 M Thr-OMe i N,N-dimethyl-
acetamid. Omsætningen udføres på analog måde som beskrevet i
5 eksempel 4. Omdannelsen til (Thr-OMe)^{B30}-h-In er 80%.

Eksempel 14

100 mg svineproinsulin opløses i 0,9 ml 3,33 M eddi-
kesyre, og der tilsættes 1 ml 2 M Thr-OMe i N,N-dimethyl-
acetamid. Blandingen behandles med immobiliseret trypsin på
10 analog måde som beskrevet i eksempel 8. Omdannelsen til
(Thr-OMe)^{B30}-h-In er 40%.

Eksempel 15

100 mg svineproinsulin opløses i 0,9 ml 3,33 M eddi-
kesyre, og der tilsættes 1 ml 2 M Thr-OMe i N,N-dimethyl-
15 acetamid. Blandingen behandles med immobiliseret trypsin på
analog måde som beskrevet i eksempel 9. Omdannelsen til
(Thr-OMe)^{B30}-h-In er 70%.

Eksempel 16

100 mg svineproinsulin opløses i 0,9 ml 3,33 M eddi-
20 kesyre, og der tilsættes 1 ml 2 M Thr-OBu^t i N,N-dimethyl-
acetamid. Omsætningen udføres på analog måde som beskrevet i
eksempel 4. Omdannelsen til (Thr-OBu^t)^{B30}-h-In er 80%.

Eksempel 17

100 mg svineproinsulin opløses i 0,9 ml 3,33 M eddi-
25 kesyre, og der tilsættes 1 ml 2 M Thr-OBu^t i N,N-dimethyl-
acetamid. Blandingen behandles med trypsin, der er immobili-
seret på glasperler, på analog måde som beskrevet i eksempel
8. Omdannelsen til (Thr-OBu^t)^{B30}-h-In er 40%.

Eksempel 18

100 mg svineproinsulin opløses i 0,9 ml 3,33 M eddikesyre, og der tilsættes 1 ml 2 M Thr-OBu^t i N,N-dimethylacetamid. Blandingen behandles med trypsin, der er immobiliseret til CNBr-aktiveret "Sephadex G-150", på analog måde som
5 beskrevet i eksempel 9. Omdannelsen til (Thr-OBu^t)^{B30}-h-In er 70%.

Eksempel 19

100 mg svineinsulin opløses i 0,5 ml 6 M eddikesyre,
10 og der tilsættes 1 ml 1 M Thr-OTmb (Tmb er 2,4,6-trimethylbenzyl) i N,N-dimethylacetamid. Der tilsættes yderligere 0,5 ml N,N-dimethylacetamid og 5 mg TPCK-behandlet trypsin i 0,1 ml vand. Reaktionsblandingen opbevares ved 32°C i 44 timer. Efter afslutning af omsætningen udfældes proteinerne ved
15 tilsætning af 10 rumfang acetone. Analyse ved DISC PAGE viser en omdannelse til (Thr-OTmb)^{B30}-h-In på 50%.

Eksempel 20

100 mg svineinsulin opløses i 0,9 ml 3 M eddikesyre, og der tilsættes 1 ml 2 M Thr-OMe i dioxan. Omsætningen udføres på analog måde som beskrevet i eksempel 4, og omdannelsen
20 til (Thr-OMe)^{B30}-h-In er 10%.

Eksempel 21

100 mg svineinsulin opløses i 0,9 ml 3 M eddikesyre, og der tilsættes 1 ml 2 M Thr-OMe i acetonitril. Omsætningen udføres på analog måde som beskrevet i eksempel 4, og omdannelsen
25 til (Thr-OMe)^{B30}-h-In er 10%.

Eksempel 22

250 mg krystallinsk (Thr-OMe)^{B30}-h-In, som er fremstillet som beskrevet i eksempel 1 - 9, 13 - 15, 20 eller 21, dispergeres i 25 ml vand og opløses ved tilsætning af 1 N natriumhydroxydopløsning til en pH-værdi på 10,0. pH-værdien holdes konstant ved 10,0 i 24 timer ved 25°C. Det dannede humaninsulin krystalliseres ved tilsætning af 2 g natriumchlorid, 350 mg natriumacetattrihydrat og 2,5 mg zinkacetatdihydrat efterfulgt af tilsætning af 1 N saltsyre til opnåelse af en pH-værdi på 5,52. De romboedriske krystaller isoleres ved centrifugering efter opbevaring i 24 timer ved 4°C, vaskes med 3 ml vand, isoleres ved centrifugering og tørres i vakuum. Udbytte: 220 mg humaninsulin.

Eksempel 23

100 mg (Thr-OTmb)^{B30}-h-In, som er fremstillet som beskrevet i eksempel 19, opløses i 1 ml iskoldt trifluoreddikesyre, og opløsningen opbevares i 2 timer ved 0°C. Det dannede humaninsulin udfældes ved tilsætning af 10 ml tetrahydrofuran og 0,97 ml 1,03 M saltsyre i tetrahydrofuran. Det dannede bundfald isoleres ved centrifugering, vaskes med 10 ml tetrahydrofuran, isoleres ved centrifugering og tørres i vakuum. Bundfaldet opløses i 10 ml vand, og opløsningens pH-værdi indstilles på 2,5 med 1 N natriumhydroxydopløsning. Humaninsulinet udfældes ved tilsætning af 1,5 g natriumchlorid og isoleres ved centrifugering. Bundfaldet opløses i 10 ml vand, og humaninsulinet udfældes ved tilsætning af 0,8 g natriumchlorid, 3,7 mg zinkacetatdihydrat og 0,14 g natriumacetattrihydrat efterfulgt af tilsætning af 1 N natriumhydroxydopløsning til opnåelse af en pH-værdi på 5,52. Bundfaldet isoleres ved centrifugering efter henstand i 24 timer ved 4°C, vaskes med 0,9 ml vand, isoleres ved centrifugering og tørres i vakuum. Udbytte: 90 mg humaninsulin.

Eksempel 24

100 mg svineinsulin opløses i 0,5 ml 10 M eddikesyre, og der tilsættes 1,3 ml 1,54 M Thr-OMe i N,N-dimethylacetamid. Blandingen afkøles til 12°C. Der tilsættes 10 mg trypsin
5 opløst i 0,2 ml 0,05 M kalciumacetat. Efter 48 timer ved 12°C udfældes proteinerne ved tilsætning af 20 ml acetone. Omdannelsen af svineinsulin til (Thr-OMe)^{B30}-h-In er 97% ved HPLC.

Eksempel 25

20 mg svineinsulin opløses i en blanding af 0,08 ml
10 10 M eddikesyre og 0,14 ml vand. Der tilsættes 0,2 ml 2 M Thr-OMe i N,N-dimethylacetamid, og blandingen afkøles til -10°C. Der tilsættes 2 mg trypsin opløst i 0,025 ml 0,05 M kalciumacetat. Efter 72 timer ved -10°C udfældes proteinerne ved tilsætning af 5 ml acetone. Omdannelsen af svineinsulin
15 til (Thr-OMe)^{B30}-h-In er 64% ved HPLC.

Eksempel 26

20 mg svineinsulin dispergeres i 0,1 ml vand. Ved tilsætning af 0,6 ml 2 M Thr-OMe i N,N-dimethylacetamid går insulinet i opløsning. Blandingen afkøles til 7°C. Der til-
20 sættes 2 mg trypsin opløst i 0,025 ml 0,05 M kalciumacetat. Efter 24 timer ved 7°C udfældes proteinerne ved tilsætning af 5 ml acetone. Omdannelsen af svineinsulin til (Thr-OMe)^{B30}-h-In er 62% ved HPLC.

Eksempel 27

25 20 mg svineinsulin opløses i 0,135 ml 4,45 M propionsyre. Der tilsættes 0,24 ml 1,67 M Thr-OMe i N,N-dimethylacetamid. Der tilsættes 2 mg trypsin i 0,025 ml 0,05 M kalciumacetat, og blandingen opbevares ved 37°C i 24 timer. Prote-

inerne udfældes ved tilsætning af 10 rumfang 2-propanol. Omdannelsen af svineinsulin til (Thr-OMe)^{B30}-h-In er 75% ved HPLC.

Eksempel 28

5 20 mg svineinsulin dispergeres i 0,1 ml vand. Der
tilsættes 0,4 ml 2 M Thr-OMe i N,N-dimethylacetamid efter-
fulgt af 0,04 ml 10 N saltsyre, hvorved insulinet går i op-
løsning. Der tilsættes 2 mg trypsin opløst i 0,025 ml 0,05 M
kalciiumacetat, og blandingen opbevares ved 37°C i 4 timer.
10 HPLC-analyse viser en 46%'s omdannelse af svineinsulin til
(Thr-OMe)^{B30}-h-In.

Eksempel 29

20 mg svineinsulin opløses i 0,175 ml 0,57 M eddike-
syre. Der tilsættes 0,2 ml 2 M Thr-OMe i N,N-dimethylacetamid
15 efterfulgt af tilsætning af 0,025 ml 0,05 M kalciiumacetat.
Der tilsættes 10 mg af et rå præparat af Achromobacter
lyticus-protease, og blandingen opbevares i 22 timer ved
37°C. Proteinerne udfældes ved tilsætning af 10 rumfang ace-
tone. Omdannelsen af svineinsulin til (Thr-OMe)^{B30}-h-In er
20 12% ved HPLC.

Eksempel 30

20 mg svineinsulin dispergeres i 0,1 ml 0,5 M eddike-
syre. Ved tilsætning af 0,2 ml 0,1 M Thr-OMe i N,N-dimethyl-
acetamid opløses insulinet. Blandingen afkøles til 12°C, og
25 der tilsættes 2 mg trypsin i 0,025 ml 0,05 M kalciiumacetat.
Efter 24 timer ved 12°C viser HPLC-analysen en 42%'s omdan-
nelse af svineinsulin til (Thr-OMe)^{B30}-h-In.

Eksempel 31

2 mg kanininsulin opløses i 0,135 ml 4,45 M eddikesyre. Der tilsættes 0,24 ml 1,67 M Thr-OMe i N,N-dimethylacetamid efterfulgt af tilsætning af 1,25 mg trypsin i 0,025 ml 0,05 M kalciumacetat. Blandingen opbevares ved 37°C i 4 timer. Analyse ved HPLC viser en 88%'s omdannelse af kanininsulin til (Thr-OMe)^{B30}-h-In. Kanininsulin eluerer før svineinsulin fra HPLC-kolonnen, idet forholdet mellem elueringsrumfanget for kanininsulin og (Thr-OMe)^{B30}-h-In er 0,72.

10 Eksempel 32

2 mg svinediarginininsulin (Arg^{B31}-Arg^{B32}-insulin) opløses i 0,135 ml 4,45 M eddikesyre. Der tilsættes 0,24 ml 1,67 M Thr-OMe i N,N-dimethylacetamid efterfulgt af tilsætning af 1,25 mg trypsin i 0,025 ml 0,05 M kalciumacetat. Blandingen opbevares ved 37°C i 4 timer. HPLC-analyse viser en 91%'s omdannelse af diarginininsulin til (Thr-OMe)^{B30}-h-In. Diarginininsulin eluerer før svineinsulin fra HPLC-kolonnen, idet forholdet mellem elueringsrumfanget for diarginininsulin og (Thr-OMe)^{B30}-h-In er 0,50.

20 Eksempel 33

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

25 Eksempel 34

20 mg svineinsulin opløses i 0,1 ml 2 M eddikesyre. Der tilsættes 0,2 ml 2 M Thr-OMe i N,N-dimethylacetamid, og blandingen afkøles til -18°C. Der tilsættes 2 mg trypsin op-

løst i 0,025 ml 0,05 M kalciumacetat, og blandingen opbevares i 120 timer ved -18°C. HPLC-analyse viser, at omdannelsen til (Thr-OMe)^{B30}-h-In er 83%.

Eksempel 35

- 5 Den i eksempel 34 angivne fremgangsmåde gentages med det forbehold, at omsætningen udføres ved 50°C i 4 timer. HPLC-analyse viser, at omdannelsen til (Thr-OMe)^{B30}-h-In er 23%.

Eksempel 36

- 10 20 mg svineinsulin opløses i 0,1 ml 3 M eddikesyre. Der tilsættes 0,3 ml 0,33 M Thr-O(CH₂)₂-SO₂-CH₃,CH₃COOH (threonin-2-(methylsulfonyl)ethylesterhydroacetat) i N,N-dimethylacetamid. Blandingen afkøles til 12°C, og der tilsættes 2 mg trypsin i 0,025 ml 0,05 M kalciumacetat. HPLC viser
15 efter 24 timer ved 12°C en 77%'s omdannelse til (Thr-O(CH₂)₂-SO₂-CH₃)^{B30}-h-In. Produktet eluerer omtrentligt ved positionen for (Thr-OMe)^{B30}-h-In.

Eksempel 37

- 20 20 mg svineinsulin opløses i 0,1 ml 10 M eddikesyre. Der tilsættes 0,2 ml 2 M Thr-OEt (Et er ethyl) i N,N-dimethylacetamid, og blandingen afkøles til 12°C. Der tilsættes 2 mg trypsin i 0,025 ml 0,05 M kalciumacetat. HPLC viser efter 24 timer ved 12°C en 75%'s omdannelse til (Thr-OEt)^{B30}-h-In. Produktet eluerer i en position lige efter
25 (Thr-OMe)^{B30}-h-In.

Eksempel 38

20 mg svineinsulin opløses i 0,1 ml 6 M eddikesyre. Der tilsættes 0,3 ml 0,67 M Thr(Bu^t)-OBu^t i N,N-dimethylacetamid. Blandingen afkøles til 12°C, og der tilsættes 2 mg

trypsin i 0,025 ml 0,05 M kalciumpacetat. Efter 24 timer ved 12°C er omdannelsen til (Thr(Bu^t)-OBu^t)^{B30}-h-In 77%. Produktet elueres fra HPLC-kolonnen under anvendelse af en gradient i acetonitril fra 27% til 40%.

5 Eksempel 39

20 mg svineinsulin opløses i 0,1 ml 4 M eddikesyre. Der tilsættes 0,2 ml 1,5 M Thr-OMe opløst i tetrahydrofuran, og blandingen afkøles til 12°C. Der tilsættes 2 mg trypsin opløst i 0,025 ml 0,05 M kalciumpacetat. Efter 4 timer ved 12°C viser HPLC-analyse en omdannelse til (Thr-OMe)^{B30}-h-In på 75%.

Eksempel 40

20 mg svineinsulin opløses i 0,1 ml 4 M eddikesyre. Der tilsættes 0,8 ml 2 M Thr-OMe opløst i 1,2-ethandiol, og blandingen afkøles til 12°C. Der tilsættes 2 mg trypsin opløst i 0,025 ml 0,05 M kalciumpacetat. Efter 4 timer ved 12°C viser HPLC-analyse en omdannelse til (Thr-OMe)^{B30}-h-In på 48%.

Eksempel 41

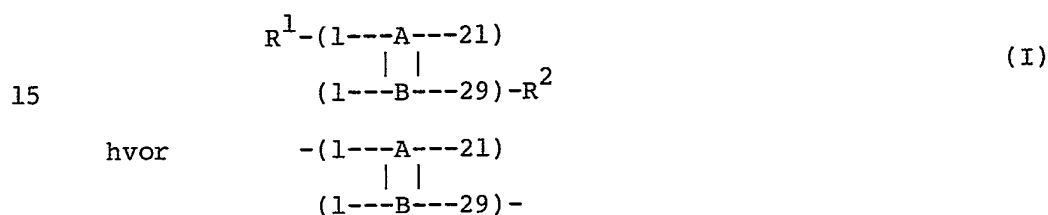
20 20 mg svineinsulin opløses i 0,1 ml 4 M eddikesyre. Der tilsættes 0,2 ml 2 M Thr-OMe opløst i ethanol, og blandingen afkøles til 12°C. Der tilsættes 2 mg trypsin opløst i 0,025 ml 0,05 M kalciumpacetat, og omsætningen udføres i 4 timer ved 12°C. HPLC-analyse viser en 46%'s omdannelse til
25 (Thr-OMe)^{B30}-h-In.

Eksempel 42

20 mg svineinsulin opløses i 0,1 ml 4 M eddikesyre.
Der tilsættes 0,2 ml 2 M Thr-OMe i acetone, og blandingen af-
køles til 12°C. Der tilsættes 2 mg trypsin opløst i 0,025 ml
5 0,05 ml kalciumacetat. Efter 4 timer ved 12°C viser HPLC-ana-
lyse en omdannelse til (Thr-OMe)^{B30}-h-In på 48%.

PATENTKRAV:

1. Fremgangsmåde til fremstilling af humaninsulin
eller threonin^{B30} estere af humaninsulin eller et salt eller
10 kompleks deraf, kendetegnet ved, at en insulinforbindelse
med den almene formel I og forskellig fra humaninsulin eller
flere forbindelser med den almene formel I



betegner human-des(Thr^{B30})insulindelen, hvori Gly^{A1} er for-
20 bundet med substituenten betegnet R¹, og Lys^{B29} er forbundet
med substituenten betegnet R², R² betegner en aminosyre el-
ler en peptidkæde indeholdende højst 36 aminosyrer, og R¹
betegner hydrogen eller en gruppe med den almene formel
R³-X-, hvor X betegner arginin eller lysin, og R³ betegner
25 en peptidkæde indeholdende højst 35 aminosyrer, eller R²
sammen med R³ betegner en peptidkæde indeholdende højst 35
aminosyrer, med det forbehold, at antallet af aminosyrer,
som er til stede i R¹ og R², er mindre end 37, eller et salt
30 eller kompleks deraf, som kan omdannes dertil, transpeptide-
res med en L-threoninester med den almene formel II



hvor R^4 betegner en carboxylbeskyttelsesgruppe, og R^5 betegner hydrogen eller en hydroxylbeskyttelsesgruppe, eller et salt deraf i en blanding af vand, et vandblandbart, organisk opløsningsmiddel og trypsin, hvorhos indholdet af vand i reaktionsblandingen er under 50% (rumfang/rumfang), og reaktionstemperaturen er under 50°C , og der eventuelt er en syre til stede, hvorefter den resulterende threonin^{B30} ester af humaninsulin om ønsket spaltes.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, **kendetegnet** ved, at koncentrationen af L-threoninester i reaktionsblandingen overstiger 0,1 molær, og at reaktionsblandingen indeholder fra 0 til 10 ækvivalenter af en syre pr. ækvivalent L-threoninester.

3. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, **kendetegnet** ved, at insulinforbindelsen er af svineoprindelse.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, **kendetegnet** ved, at der som insulinforbindelse anvendes relativt rått insulin.

5. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, **kendetegnet** ved, at reaktionstemperaturen er under 37°C , fortrinsvis under stuetemperatur, og over 0°C .

6. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, **kendetegnet** ved, at indholdet af vand i reaktionsblandingen er mellem 43 og 10% (rumfang/rumfang).

7. Fremgangsmåde ifølge krav 6, **kendetegnet** ved, at indholdet af vand i reaktionsblandingen er mellem 43 og 20% (rumfang/rumfang).

8. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1 - 5, **kendetegnet** ved, at insulinforbindelsen er svineinsulin, at L-threoninesteren er Thr-OMe eller Thr-OBu^t, at det vandblandbare, organiske opløsningsmiddel er N,N-dimethylformamid eller N,N-dimethylacetamid, at reaktionstemperaturen er ca. 37°C , at indholdet af vand i reaktionsblandingen er mellem 41 og 43%, at vægtforholdet mellem

trypsin og insulinforbindelsen er ca. 1:8, at molforholdet mellem L-threoninesteren og insulinforbindelsen er ca. 120:1, og at der er tilsat mellem 1,2 og 1,5 ækvivalenter eddikesyre pr. ækvivalent L-threoninester.

Fremdragte publikationer:

US patent nr. 3276961

Nature, bind 280, side 412-413

Biochem. & Biophys. Res. Commun., 29.jan. 1980, 92(2),
side 396-402.