(19) DANMARK (11) **DK 173007 B1**

(12) PATENTSKRIFT

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(51) Int.Cl⁶.: **C 12 P 21/06** **C 07 K 14/62**

(21) Patentansøgning nr: **PA 1983 01616**

(22) Indleveringsdag: **1983-04-13**

(24) Løbedag: **1983-04-13**

(41) Alm. tilgængelig: **1983-10-22**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **1999-11-08**

(30) Prioritet: **1982-04-21 NL 8201650**

(73) Patenthaver: **AKZO N.V., Velperwag 76, 6826 DW Arnhem, Holland**

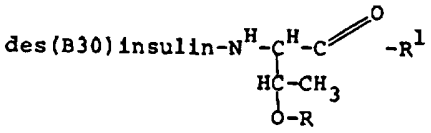
(72) Opfinder: **Gijsbert Willem Karel van Dedem, Bachlaan 23, Heesch, Holland**
Francois Egbert Abraham van Houdenhoven, Rijksweg 125B, Heesch, Holland

(74) Fuldmægtig: **Chas. Hude A/S, H.C. Andersens Boulevard 33, 1553 København V, Danmark**

(54) Benævnelse: **Fremgangsmåde til semisyntetisk fremstilling af humaninsulin og modificeret humaninsulin til brug ved fremgangsmåden**

(56) Fremdragne publikationer:
EP A 0045187
Carlsberg Res. Commun. 46, 361-372 (1981)

(57) Sammendrag:
Humaninsulin fremstilles semi-syntetisk ved anvendelse af en ny metode, der omfatter fremstilling af et modificeret humaninsulin med den almene formel



hvori R = H eller en enzymatisk fraskillelig sukkerrest eller en ester deraf, og R^1 = en enzymatisk fraskillelig sukkerrest eller en ester deraf eller en aminosyre eller et peptid eller et amid eller ester af sidstnævnte to, eller R^1 = OH, hvis R ≠ H, efterfulgt af enzymatisk fjernelse af de modificerende grupper R og/eller R^1 til dannelse af humaninsulin.

Den foreliggende opfindelse angår en særlig fremgangsmåde til semisyntetisk fremstilling af humaninsulin, som går ud fra et hidtil ukendt modificeret humaninsulin og påfølgende enzymatisk fjernelse af de modificerende grupper til dannelse af humaninsulin, samt hidtil ukendte mellemprodukter til brug ved denne fremgangsmåde.

Hypoglykæmi som følge af insulinmangel i blodet (diabetes mellitus) kan behandles ved at administrere insulin, f.eks. ved injektion eller ved hjælp af en doseringspumpe. Specielt anvendes der til dette formål insulin isoleret af pancreas fra dyr, såsom svin eller kvæg.

Insulinpræparater af denne art har antigenisk virkning eller allergenisk virkning i visse tilfælde. Dette kan delvis skyldes tilstedeværelsen af urenheder (f.eks. proinsulin, partielle dekomponeringsprodukter deraf, arginin-insulin, insulin-ethylester, monodeamino-insulin eller insulinaggregater). Desuden kan den antigeniske virkning også vedrøre strukturelle forskelle mellem animalske insulintyper og humaninsulin, som bevirker, at proteinet fremkommet af dyr afvises af det menneskelige legeme. Svineinsulin og humaninsulin adskiller sig f.eks. ved én aminosyre, nemlig aminosyren med endestillet carboxy i den såkaldte B-kæde. Denne såkaldte B30 aminosyre er alanin i svineinsulin, men threonin i humaninsulin. Svineinsulin kunne derfor omdannes til humaninsulin ved at erstatte denne B30 aminosyre med threonin, og der kendes forskellige fremgangsmåder til at gøre dette.

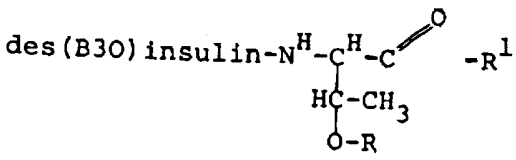
Næsten alle kendte metoder begynder naturligvis med at fjerne B30 aminosyren: Hvor det drejer sig om svineinsulin bliver alaninet derfor fjernet. Dette frembringer des(B30)insulin, ofte også kaldet des(Ala)insulin eller kort DAI. Til påfølgende processer kendes flere alternative metoder, som fører til dannelsen af humaninsulin. Disse er baseret på enzymatisk eller ikke-enzymatisk binding af threonin, hvor carboxylgruppen beskyttes, f.eks. med en ester, til des(B30)insulin. Den beskyttende gruppe skal fjernes efter threoninbindingen. En almindeligt anvendt beskyttende gruppe er en tertiær butoxygruppe. Ret drastiske betingelser er nødvendige for at fjerne denne, især en ekstrem pH-

værdi, som også påvirker den resterende del af insulinmolekylet. Som følge heraf opstår partielle nedbrydningsprodukter af insulin, som er praktisk taget umulige at separere fra det ønskede produkt, nemlig humaninsulin. Der fås derfor et meget urent insulinpræparat. Rensningen udgør også et betydeligt problem på et tidligere stadium med adskillelse af det reagerede og ureagerede des(B30)insulin fra reaktionsblandingen, hvori threoninbindingen er udført. Disse adskillelser giver et utilstrækkeligt rent materiale, især ved fremstilling i stor målestok, undtagen på bekostning af meget store tab.

Fra EP-A1-0 045 187 kendes en fremgangsmåde til fremstilling af humaninsulin ved transpeptidering af svineinsulin med et threonin-derivat omfattende en sædvanlig beskyttende gruppe efterfulgt af enzymatisk fjernelse af den beskyttende gruppe. Denne kendte fremgangsmåde fører imidlertid til et udbytte af insulin, der ikke er så højt som udbyttet, der opnås ifølge US patent nr. 4.320.196, jvf. Breddam et al., "Carboxypeptidase Y Catalyzed C-terminal Modification in the B-chain of Porcine Insulin", Carlsberg Res. Commun. 46, 361-372 (1981). Dette sidstnævnte udbytte er imidlertid kun 43% humaninsulin med en renhed på 77% (og det førstnævnte således endnu mindre).

I modsætning til den kendte fremgangsmåde, hvor man fremstiller humaninsulin ved at fraspalte en aminosyre fra des(b30)insulin-thr-thr-NH_2 ved hjælp af en carboxypeptidase, har det vist sig, at man kan opnå et overraskende højt udbytte af humaninsulin, når man fraspalter diphenylgruppen fra des(b30)insulin-thr-phe-phe ved hjælp af carboxypeptidase A. Man opnår tilmed et meget rent produkt, uden at det er nødvendigt at foretage mange separationer og rensninger, som reducerer udbyttet.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at man fra et modificret humaninsulin med den almene formel I



(I)

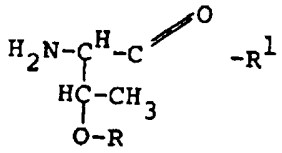
hvori

R = H eller en enzymatisk fraspaltelig sukkerrest eller en ester deraf, og

R^1 = phe, phe-phe eller phe-phe-phe,

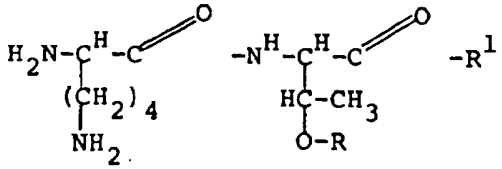
ved anvendelse af carboxypeptidase A enzymatisk fraspalter phe, phe-phe eller phe-phe-phe, hvorefter man isolerer human-insulin fra mediet.

Det modificerede humaninsulin, som er vist ved formlen I, kan bekvemt fremstilles ved, at man til des(B30)insulin binder forbindelsen II



(II)

eller ved, at man til des(B29,B30)insulin binder forbindelsen III



(III)

hvori R og R^1 i begge forbindelser har den ovenfor beskrevne betydning.

Des(B30)insulin kan fremstilles separat ved behandling af animalsk insulin, som bortset fra B30-aminosyren på alle punkter er identisk med humaninsulin, med et egnet enzym, f.eks. med carboxypeptidase A eller med lysylendopeptidase fra Achromobacter lyticus. En des(B30)insulinrest kan dog fremstilles in situ, i hvilket tilfælde fjernelsen af B30-aminosyren og bindingen af forbindelsen II opnås ved en såkaldt transpeptidasereaktion med et enkelt enzym, f.eks. trypsin.

Des(B29,B30)insulin kan ligeledes fremstilles ud fra et egnet animalsk insulin under anvendelse af en peptidase, der specifikt spalter prolin-lysin-peptidbindingen.

Forbindelsen II kan bindes til B29-lysin i det tidligere fremstillede des(B30)insulin, f.eks. ved hjælp af trypsin eller med ethvert andet enzym med trypsin-lignende virkning, såsom lysylendopeptidase. Bærerbundne enzymer kan anvendes, i hvilket tilfælde enzymet og opløsningen med modificeret insulin blot kan adskilles, efter at reaktionen er afsluttet.

Den covalente binding mellem gruppen R og/eller R^1 og humaninsulinet skal kunne brydes enzymatisk.

Denne betingelse bestemmer i vidt omfang valget af gruppen R og/eller R^1.

Sukkerarter, der kan anvendes ifølge opfindelsen som gruppen R, er mono-, di- eller polysaccharide rne. Især foretrækkes mono- og disaccharider, såsom glucose, fructose, mannose, galactose, sucrose, maltose og lactose. På grund af deres stærkt polære karakter har sukkerarter bundet til insulin en meget gunstig virkning på adskillelse og rensning af proteinet.

For at fremstille humaninsulinet skal residualgrupperne R og/eller R^1 fjernes enzymatisk fra det modificerede humane insulin med den almene formel I. Valget af residualgruppe

bestemmer hvilket enzym eller hvilken kombination af enzymer, der er egnet til dette formål.

Gruppen R^1 fraspaltes ved hjælp af carboxypeptidase A. En carboxypeptidase er en exopeptidase, der kan fjerne en aminosyre, den ene efter den anden, fra peptidkæden begyndende med det endestillede carboxy, og som udviser præference for bestemte aminosyrer.

Carboxypeptidase A (CPA) fraspalter hydrofobe aminosyrer, herunder især mono-, di- og trimeren af phenylalanin.

Opfindelsen angår endvidere de modificerede humaninsuliner med den almene formel I, hvor R=H.

Opfindelsen illustreres nærmere ved de følgende eksempler.

I de følgende eksempler anvendes i hvert tilfælde som grundlag des(B30)insulin fremstillet af svineinsulin efter fremgangsmåden, der er beskrevet af E.W. Schmitt m.fl. (Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chemie 359, 799 (1978), det såkaldte des(Ala)insulin (DAI)).

Eksempel I-VI

Binding af di- og tripeptider til DAI

Bindingen foretages med forskellige substrater (di- og tripeptider og HCl-salt af tripeptid) med forskellige enzymsystemer (trypsin og bærerbundet trypsin og lysylendopeptidase).

Disse bindinger foretages som følger:

(a) Et buffermedium sammensættes af

- 1:1 blanding af dimethylformamid og ethanol

(= den såkaldte organiske fraktion) og

- en vis mængde tris-HCl-buffer med en koncentration på 0,5 mol liter^{-1}.

(b) En afvejet mængde substrat opløses i dette buffermedium sammen med en mængde DAI.

(c) Denne blanding hæves til den ønskede pH-værdi ved hjælp af koncentreret NaOH (1 mol liter^{-1}).

(d) Der tilsættes en mængde bindingsenzym, hvorefter bindingsreaktionen begynder og fortsættes ved 37°C.

(e) Efter afslutning af reaktionsperioden fraskilles reaktionsproduktet chromatografisk, hvorefter udbyttet af bindingsproduktet bestemmes af chromatogrammet og udtrykkes som en procentdel af den teoretiske værdi.

Reaktionsbetingelserne og udbyttet for eksemplerne I-VI fremgår af tabel 1.

Tabel 1

Eks. nr. betingelser	I	II	III	IV	V	VI
koncentration DAI ($g.l^{-1}$)	67,1	66,6	13,6	25,2	32,2	32,2
substrat	thr-phe	thr-phe	thr-phe phe	thr-phe phe-HCl	thr-phe phe-HCl	thr-phe phe
koncentration ($mol.\ l^{-1}$)	0,176	0,175	0,067	0,037	0,047	0,025
enzym ($g.l^{-1}$); trypsin: trypsin siliciumdioxid: lysylendo-peptidase siliciumdioxid	2,7	808	5	77	157	157
medium (% organisk fraktion)	60	60	67	60	60	60
pH	6,2	6,5	6,5	6,3	6,5	6,5
reaktionstid (timer)	1/3	1	7/12	48	3	3
udbytte (% af teoretisk)	53	28	54	38	27	16

Eksempel VII

Chromatografisk adskillelse af bindingsprodukter

Der er foretaget en sammenligning mellem den chromatografiske opførsel af peptidbundet DAI og opførslen af esterbundet DAI.

Til dette formål fremstilledes bindingsprodukterne af DAI med thr-O-methyl, thr-O-tBu, thr-phe-O-methyl og thr-phe-phe på den måde, der er beskrevet i eksempel I-VI.

Bindingsbetingelserne var: DAI-koncentration 14 g liter^{-1}, 0,06 mol liter^{-1} substrat, 2,5 liter^{-1} trypsin, 67% organisk fraktion i medium med pH 6,4 og en reaktionsperiode på 1/2 time.

Bindingsprodukterne blev fraskilt på en analytisk HPLC-søjle, og retentionsværdierne (Rf) bestemt. Resultaterne af denne fraskillelse fremgår af tabel 2 som forskellen mellem retentionsværdien af bindingsprodukterne og af DAI (ΔRf).

Tabel 2

Koblet til DAI	ΔRF (sek.)
thr-O-methyl	220
thr-O-tBu	1000
thr-phe-O-methyl	1400
thr-phe-phe	1700

Eksempel VIII

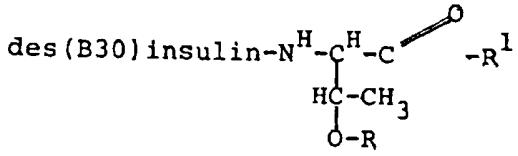
Fjernelse af bundet gruppe phe-phe fra DAI-thr-phe-phe

Efter fraskillelse af uomdannet DAI og bindingsprodukt DAI-thr-phe-phe på en hydrofob søjle fremkom en fraktion på 23 ml, som indeholdt 0,85 mg ml^{-1} bindingsprodukt. Dette bindingsprodukt blev frysetørret og derpå opløst i 0,2 mol $liter^{-1}$ ammoniumbicarbonatbuffer, pH 8,5, til en slutkoncentration på ca. 2,8 mg ml^{-1}. Til denne opløsning blev sat 2 μl carboxypeptidase A (2,3 E). Reaktionen blev standset efter 30 minutter ved tilsætning af et lige så stort volumen 0,5 mol $liter^{-1}$ citronsyre. Materialet blev så krystalliseret.

En undersøgelse viste, at bindingsproduktet var blevet fuldstændigt omdannet til humaninsulin som påvist ved hjælp af aminosyreanalyse. Efter krystallisation kunne der ikke påvises andre aminosyrer end phenylalanin i supernatanten ved hjælp af aminosyreanalyse.

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til semisyntetisk fremstilling af humaninsulin, kendetegnet ved, at man fra et modificeret humaninsulin med den almene formel I



(I)

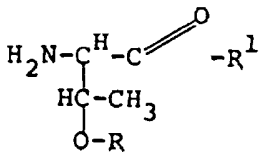
hvori

R = H eller en enzymatisk fraspaltelig sukkerrest eller en ester deraf, og

R^1 = phe, phe-phe eller phe-phe-phe,

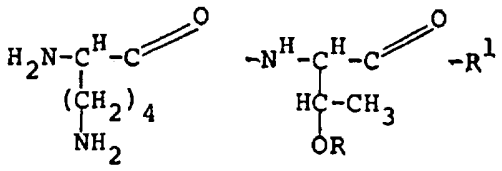
ved anvendelse af carboxypeptidase A enzymatisk fraspalter phe, phe-phe eller phe-phe-phe, hvorefter man isolerer humaninsulin fra mediet.

2. Fremgangsmåde til semisyntetisk fremstilling af humaninsulin ifølge krav 1, kendetegnet ved, at man til des(B30)insulin eller en des(B30)insulinrest binder forbindelsen



hvori R og R^1 har de i krav 1 anførte betydninger, hvorefter man ved anvendelse af carboxypeptidase A enzymatisk fraspalter phe, phe-phe eller phe-phe-phe og isolerer humaninsulin fra mediet.

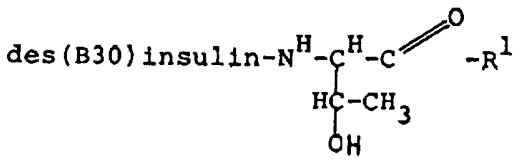
3. Fremgangsmåde til semisyntetisk fremstilling af humaninsulin ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at man til des(B29,B30)insulin binder forbindelsen



hvori R og R' har de i krav 1 anførte betydninger, hvorefter man ved anvendelse af carboxypeptidase A enzymatisk fraspalter phe, phe-phe eller phe-phe-phe og isolerer humaninsulin fra mediet.

4. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1-3, k e n d e t e g n e t ved, at R er H.

5. Modificeret humaninsulin til brug ved fremgangsmåden ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det har formlen



hvor R' er phe, phe-phe eller phe-phe-phe.