

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 146482 B



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: 1556/80

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

(22) Indleveringsdag: 11 apr 1980

(41) Alm. tilgængelig: 14 okt 1980

(44) Fremlagt: 17 okt 1983

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 13 apr 1979 JP 45710/79 13 apr 1979 JP 45711/79

(71) Ansøger: *SHIONOGI & CO. LTD.; Osaka, JP.

(72) Opfinder: Kazuyuki *Moriwara; JP, Tatsushi *Oka; JP, Hiroshige *Tsuzuki; JP, Masami *Soejima; JP,
Takeharu *Masaki; JP.

(74) Fuldmægtig: Th. Ostenfeld Patentbureau A/S

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af et B30-threonin-insulin

(57) Sammendrag:

1556-80

Ved en fremgangsmåde til fremstilling af et B30-threonin-insulin omsættes et des-B30-insulin med en overskudsmængde threoninderivat i nærværelse af et enzym, som specifikt virker på basisaminosyre-carbonylet i peptidbindinger.

UK 146482 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af et B30-threonin-insulin, herunder human insulin.

Insulin er et uundværligt lægemiddel til behandling af diabetes. Okse-og svineinsulin kan i øjeblikket fås i handelen. Disse insuliner afviger imidlertid fra human insulin ved nogle få aminosyrekomponenter, som bevirker dannelse af antistof i patienter. Antistoffet vides at formindske effektiviteten af videre insulinbehandling. Human insulin er derfor mere gunstigt, og der har været et stærkt ønske om at kunne få det i handelen. Human insulin afviger fra andre animalske insuliner ved aminosyrekomponenterne i stillingerne 8, 9 og 10 i A-kæden og i B-kædens 30-stilling. Den foreliggende opfindelse tilvejebringer en fremgangsmåde til erstatning af aminosyren i 30-stillingen i et animalsk insulins B-kæde med L-threonin. Human insulin kan følgelig let fremstilles ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen ved som udgangsmateriale at anvende svineinsulin. Svineinsulin afviger fra human insulin ved aminosyren i B30-stillingen. Human insulin opnået på denne måde kan med fordel anvendes til behandling af diabetes patienter. Opfindelsen tilvejebringer desuden andre B30-threonin-insuliner ved anvendelse af andre animalske insuliner som udgangspunkt. De resulterende insuliner afviger fra human insulin ved aminosyrer i A-kædens 8-, 9- og 10-stilling, og de kan anvendes som reagenser til prøver for antigenicitet og som diabetes lægemidler.

Human insulin er blevet fremstillet kemisk af M.A. Ruttenberg som vist i U.S.A. patentskrift nr. 3.903.068 og af R. Obermeier et al. som beskrevet i Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 357, 759-767 (1976). Disse fremgangsmåder omfatter kondensation af et desoctapeptid-(B23-30)-svineinsulin med et syntetisk octapeptid, der svarer til stillingerne B23-30 i human insulin. Den første fremgangsmåde omfatter imidlertid alkalisk hydrolyse, som ledsages af uheldige bi-reaktioner. Sidstnævnte fremgangsmåde er også en ikke-specifik omsætning, som bevirker mange bireaktioner og kræver komplicerede rensningsprocedurer. Disse fremgangsmåder kan derfor ikke anvendes i industriel målestok.

M. Bodanszky et al. tilvejebringer i U.S.A. patentskrift nr. 3.276.961 en fremgangsmåde til fremstilling af human insulin, ved hvilken human insulin fremstilles ud fra andre animalske insuliner

ved indvirkning af et enzym, såsom carboxypeptidase A eller trypsin, i nærværelse af threonin. Det er ikke sandsynligt, at denne fremgangsmåde vil frembringe human insulin, fordi trypsin og carboxypeptidase A ikke kun hydrolyserer lysyl-alaninpeptidbindingen (B29-B30), men også andre positioner i insulin under de i patentskriftet beskrevne betingelser. Trypsin hydrolyserer fortrinsvis arginyl-glycinpeptidbindingen (B22-B23) frem for lysyl-alaninbindingen (B29-B30). Carboxypeptidase A kan ikke frigøre alaninen ved B-kædens C-terminal alene uden at frigøre asparagin ved A-kædens C-terminal. En speciel betingelse, dvs. omsætning i en ammoniumhydrogen-carbonatpufferopløsning, er nødvendig for at forhindre asparaginfri-
 05 gørelsen. Denne betingelse blev opdaget i 1978 (Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 359, 799-802 (1978)). Desuden kan peptidsyntese næppe finde sted, fordi hydrolysen sker hurtigere end syntesen i
 10 denne tilstand.

Det konkluderes derfor, at der indtil nu ikke har været nogen industriel tilgængelig fremgangsmåde til fremstilling af human insulin.

Den foreliggende opfindelse kan imidlertid tilvejebringe human insulin i kommerciel målestok. Fremgangsmåden ifølge opfindelsen til
 20 fremstilling af et B30-threonin-insulin er ejendommelig ved, at man omsætter et des-B30-insulin (herefter betegnet forbindelse II) med et overskud af et L-threoninderivat (herefter betegnet forbindelse I) med den almene formel:



hvor Thr står for en L-threoninrest, R^1 er hydrogen eller en hydroxybeskyttende gruppe, og R^2 er en carboxylbeskyttende gruppe, i
 30 nærværelse af trypsin eller et tryptsinlignende enzym og i en reaktionsblanding med en pH-værdi på ca. 5-9 og en temperatur på ca. 0-50°C og indeholdende et vandblandbart organisk opløsningsmiddel, hvorpå den eller de beskyttende grupper fjernes. Denne fremgangsmåde frembyder mange fordele. Det er en specifik omsætning, som ikke ledsages af nogen ugunstig bireaktion, såsom racemisering.
 35 Desuden kan uomsatte udgangsmaterialer let genvindes uden at være ødelagt, og de kan genanvendes. Fremgangsmåden benytter et overskud af et L-threoninderivat. Overskudet af threoninderivatet hin-

drer brydning af arginincarbonylbindingen i B-kædens 22-stilling, selv om denne binding sædvanligvis spaltes med trypsin. Den beskyttelse af argininresten, som er ufravigelig ved sædvanlig enzymatisk omsætning, er følgelig ikke nødvendig ved denne fremgangsmåde.

Forbindelse II kan fremstilles ved omsætning af forskellige animalske insuliner (f.eks. svine-, kvæg-, hval-, fåre-, kanin-, fiske-, abeinsulin, og lignende) med carboxypeptidase A som beskrevet af E.W. Shimitt et al. i Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem., 359, 799 (1978). Det kan også fremstilles ved anvendelse af en protease fremstillet af *Achromobacter lyticus*. Proteasen har en specificitet over for lysin og spalter specifikt lysincarbonylbindingen i peptidbindinger. Isolering og karakteristika er beskrevet af Masaki et al. i Agric.Biol. Chem., 42, 1443 (1978). Enzymet kaldes Protease I. Fremstillingen af des-B30-svineinsulin er beskrevet i Biochem.Biophys.Res.Comm., 92, 396-402 (1980) og japansk offentliggørelsesskrift 54-135789. Des-B30-insuliner af andre dyreinsuliner kan fremstilles på samme måde.

Forbindelse I's hydroxygruppe kan være beskyttet eller ej. Begge forbindelser kan benyttes ved omsætningen. Den beskyttende gruppe, som anvendes, udvælges blandt vilkårlige af de hydroxybeskyttende grupper, der i almindelighed anvendes ved peptidsyntese, såsom t-butyl, benzyl, acetyl og lignende. Forbindelse I's carboxylgruppe skal være beskyttet, og der kan anvendes en hvilken som helst af de ved peptidsyntese anvendte carboxylbeskyttende grupper, f.eks. i form af alkylestere (f.eks. t-butylestere), aralkylestere (f.eks. benzylester), amid, substituerede amider (f.eks. anilid), salte (f.eks. natrium), osv.

En beskyttende gruppe bør udvælges under hensyntagen til indførings- og fjernelsesomsætningernes indvirkning på insulin, da omsætningerne kan resultere i denaturering eller inaktivering af insulinet. Hvis en hydroxybeskyttende gruppe og en carboxylbeskyttende gruppe for threoninresten udvælges hensigtsmæssigt, er én fjernelsesprocedure tilstrækkelig til at fjerne begge de beskyttende grupper. Beskyttende grupper, der anvendes ved peptidsyntese, er beskrevet nærmere af M. Bodanszky et al. i Peptide Synthesis, 2. udgave (1976) udgivet af John Wiley & Sons.

Det ved fremgangsmåden anvendte enzym indbefatter enzymer, der kan fås fra forskellige planter og dyr. Som tidligere nævnt udføres omsætningen i nærværelse af trypsin eller et tryptsinlignende enzym. Til illustration af tryptsinlignende enzymer kan nævnes sådanne enzymer, som den af Morihara et al. isolerede protease, Arch. Biochem. Biophys., 126, 971 (1968), og den af Yoshida et al. i FEBS Lett., 15, 129 (1971) beskrevne protease. Enzymet, som skal anvendes, kan behandles med tosyl-L-phenylalaninchlormethylketon (herefter forkortet TPCK) til fjernelse af blandede enzymer, såsom chymotrypsin og chymotrypsinlignende enzym.

Desuden er Protease I, der produceres af *Achromobacter lyticus* M497-1, et tryptsinlignende enzym og medregnet blandt enzymerne, der kan anvendes. Protease I virker specifikt på lysincarbonyl i peptidbindinger, og dets isolering og karakteristika er beskrevet i Agric. Biol. Chem., 42, 1443 (1978).

Kondensationen af forbindelse I med forbindelse II gennemføres under betingelser, der er egnede til peptidsyntese med ovenstående enzymer. Omsætningen gennemføres således ved et pH på ca. 5 til 9, fortrinsvis pH ca. 6 til 7. Omsætningstemperaturen er ca. 0-50°C, fortrinsvis ca. 20-40°C. Det ønskes, at koncentrationen af såvel forbindelse I som forbindelse II er så høj som mulig. Det foretrukne molforhold mellem forbindelse I og forbindelse II er ca. 5:1 til 1000:1, især ca. 25:1 til 200:1. Reaktionsblandingen indeholder som nævnt et vandblandbart organisk opløsningsmiddel. Tilsætningen af organisk opløsningsmiddel sænker reaktionsblandingsens vandkoncentration, hvilket resulterer i, at den omvendte reaktion, dvs. hydrolyse af produktet hindres, og forøger også bemærkelsesværdigt opløseligheden af forbindelserne I og II. De organiske opløsningsmidler til brug herfor er f.eks. methanol, ethanol, dimethylformamid, dimethylsulfoxid, glycerol, og lignende. De kan anvendes enkeltvis eller som en blanding. Den foretrukne koncentration af det organiske opløsningsmiddel er ca. 0-65%, især ca. 40-60% af reaktionsblandingen. Den relative mængde af det organiske opløsningsmiddel bør bestemmes af udgangsmaterialernes opløselighed, enzymets tilbøjelighed til denaturering og dets hydrolyseaktivitet.

Reaktionsmediet kan udvælges blandt trishydroxymethylaminomethan (herefter forkortet til tris), carbonat, boratpufferopløsnings-

ger, og lignende. Enzymkoncentrationen bestemmes i afhængighed af koncentrationen af substrater og enzymaktiviteten. F.eks. anvendes krystallinsk trypsinhandelsvare fortrinsvis i en koncentration fra ca. 1 mg/ml til 10 mg/ml. Enzymet kan anvendes, som det er, eller
05 i fixeret form, såsom i kombination med eller som inklusion i en uopløselig bærer, såsom cellulose, dextran (f.eks. "Sephadex"), agarose (f.eks. "Sephacrose"), polyacrylamidgel ("Bio-gel"), porøst glas, og lignende.

Reaktionstiden er variabel og påvirkes af andre reaktionsbetingelser. Omsætningen kan fortsættes, indtil substratet og produktet
10 kommer i ligevægt. Det tager i almindelighed ca. 3 til 72 timer, og i de fleste tilfælde ca. 6 til 24 timer.

Insulinproduktet kan isoleres ved kombination af de sædvanlige inden for peptidkemi anvendte metoder. Til illustration kan nævnes
15 følgende isoleringsfremgangsmåde: Reaktionsblandingen underkastes gelfiltrering til isolering og opsamling af uomsat forbindelse I og enzym. Udvundet forbindelse I og enzym kan genanvendes. Den tilbageværende del underkastes passende kromatografi til isolering af opnået beskyttet insulin og uomsat des-B30-insulin. Sidstnævnte kan gen-
20 anvendes som forbindelse II. Førstnævnte underkastes en omsætning til fjernelse af den eller de beskyttende grupper.

Fjernelsen af den eller de beskyttende grupper gennemføres på sædvanlig måde, idet metoden dog skal udvælges i afhængighed af den beskyttende gruppes egenskaber. En t-butylgruppe er et eksem-
25 pel på en beskyttende gruppe for såvel threoninens hydroxygruppe som dens carboxylgruppe. Den kan fjernes ved behandling med trifluoreddikesyre i nærværelse af et kation-opfangningsmiddel, f.eks. anisol. Som nævnt ovenfor bliver processen simpel, hvis en enkelt behandling kan fjerne den hydroxybeskyttende og den carboxylbeskyttende gruppe på én gang, og den resulterer i godt udbytte. Når
30 C-terminalen i det opnåede insulin beskyttes med en anden ester, et amid, substitueret amid eller salt, kan den beskyttende gruppe fjernes ved passende hydrolyse- eller afsaltningsteknik.

Det ifølge opfindelsen fremstillede insulin er nyttigt til behand-
35 ling af diabetes og også som reagens.

Det ifølge opfindelsen opnåede insulin viser samme aktivitet til sænkning af blodsukkerniveau som okseinsulin i mus på følgende måde:

Testmetode: Testforbindelsen opløses i 0,01M saltsyre, og opløsningen fortyndes til en passende koncentration (2,5 - 20 µg/ml) med 20 til 60 gange fysiologisk saltopløsning. Den resulterende opløsning administreres intravenøst i en mængde på 0,1 ml/10 g legemsvægt til DS mus, der har fastet i 5 timer. Blod udtages fra orbital blodkar 45 minutter efter administreringen, og blodsukker måles ved hjælp af glucose-oxidasemetoden under anvendelse af et i handelen værende udstyr fremstillet af Boehringer Mannheim Corporation.

10

Tabel I
Insulinaktivitet

Test- forbindelse	Dosis (µg/10 g legemsvægt)	Blodglucoseniveau (mg/dl)
Fysiologisk saltopløsning	-	112,2 ± 7,3 (1)
Semisyntetisk human insulin	0,25 1	80,2 ± 2,6 (2) 41,0 ± 6,0 (3)
Okseinsulin	0,25 1	73,2 ± 1,5 (4) 41,0 ± 2,3 (5)

20

Note: (2)-(4), (3)-(5) ingen signifikant forskel.

25

Human insulin fremstillet ifølge opfindelsen kan administreres til mennesker på samme måde som de på markedet værende svine- eller okseinsulinpræparater. Det kan anvendes til farmaceutiske præparater på sædvanlig måde. F.eks. kan det udformes som en injicerbar opløsning ved hjælp af passende fremgangsmåder, såsom fremgangsmåder til fremstilling af zinkkompleks med zinkchlorid, en pufret opløsning med en passende puffer, såsom natriumhydrogenphosphat, natriumacetat, og lignende, og en isotonisk opløsning med natriumchlorid. Desuden kan der tilsættes passende antiseptiske midler. Sådanne er f.eks. cresol, phenol, para-hydroxybenzoesyrealkylestere (f.eks. methyl-, ethyl-, propyl-, butylestere, og lignende). Dose-

30

35

ringen af den humane insulin er som for insulinpræparaterne på markedet. Der kan således administreres ca. 1 til 100 enheder til voksne mennesker pr. dag, om end dosis afhænger af, hvor alvorlig diabetes lidelsen er.

- 05 De efterfølgende eksempler tjener til yderligere illustration og beskrivelse af den foreliggende opfindelse. Forkortelserne har følgende betydning: Ala: alanin, Arg: arginin, Asp: asparaginsyre, CysO₃H: cysteinsyre, Glu: glutaminsyre, Gly: glycin, His: histidin, Ile: isoleucin, Leu: leucin, Lys: lysin, Phe: phenylalanin, Pro: pro-
- 10 lin, Ser: serin, Thr: threonin, Tyr: tyrosin, Val: valin, Obu^t: t-butylesterrest.

Eksempel 1

(1) Desalanin-(B30)-svineinsulin

- 15 Til en opløsning af svineinsulin (500 mg) i 0,1M ammoniumhydrogencarbonat (100 ml, pH 8,3) sættes krystallinsk carboxypeptidase A (5 mg, Worthington Co., forbehandlet med diisopropylfluorophosphat, 49 u/mg). Blandingen inkuberes ved stuetemperatur i 8 timer. Inkubationen afbrydes, når alanin frigøres i forhold på
- 20 0,77M/1M insulin. Reaktionsblandingen lyofiliseres. Produktet opløses i 0,5M eddikesyre og adsorberes på en søjle af "Sephadex G 50" (3,5 x 95 cm) af yderst fine partikler. Søjlen elueres med 0,5M eddikesyre med en portion på 11,5 ml pr. fraktion. Fraktion nr. 40-60 opsamles og lyofiliseres til frembringelse af den i overskriften anførte
- 25 forbindelse (460 mg). Udbyttet er 92%.

Produktet hydrolyseres til aminosyreanalyse med 6M saltsyre ved 110°C i 24 timer, hvorved følgende resultat fås. De i parentes viste tal er i hele beskrivelsen de teoretiske værdier.

- 30 Aminosyreanalyse: Lys 1,00 (1), His 1,91 (2), Arg 0,95 (1), Asp 3,21 (3), Thr 2,09 (2), Ser 2,97 (3), Glu 7,35 (7), Gly 4,29 (4), Ala 1,26 (1), CysO₃H 5,94 (6), Val 3,86 (4), Ile 1,55 (2), Leu 6,53 (6), Tyr 4,08 (4), Phe 3,22 (3), Pro 1,2 (1).

(2) [B30-Thr-Obu^t]-svineinsulin

- 35 Ovenstående produkt (100 mg, 10 mM) og L-threonin-t-butylester (205 mg, 500 mM) opløses i en blanding (1,05 ml) af ethanol og dimethylformamid (1:1, vol./vol.) Til opløsningen sættes en op-

løsning af krystallinsk trypsin (4 mg, Worthington Co., omkrystalliseret tre gange) i 0,5M boratpufferopløsning (0,75 ml, pH 6,5) og TPCK til en slutkoncentration på 0,01 mM. Blandingen holdes natten over ved 37°C. Produktet bekræftes med hp væskekromatografi, og det beregnede udbytte er 75%. Blandingen gøres sur med iseddikesyre og underkastes gelfiltrering med en søjle af "Sephadex G 50" (4,2 x 130 cm) af yderst fine partikler, hvorved der fås tre fraktioner svarende til trypsin, det i overskriften anførte insulinderivat og L-threonin-t-butylester. Målinger af enzymaktivitet og ninhydrinreaktion viser, at henholdsvis trypsin og L-threonin-t-butylester genvindes 50%.

Den fraktion, der indeholder insulinderivatet, lyofiliseres til frembringelse af et råt pulver (89 mg) af den i overskriften anførte forbindelse. Produktet fyldes ved 4°C på en søjle af "DEAE-Sephadex A 25" (1,9 x 24,5 cm), som på forhånd er ligevægtsindstillet med 0,01M trispufferopløsning (pH 7,6) og 7M urinstof. Søjlen elueres med ovenstående pufferopløsning (800 ml), og der frembringes så en lineær Na⁺ gradient (til 0,3M NaCl), og der fås en fraktion A nær ved 0,08 til 0,09M koncentration og en fraktion B nær ved 0,13 til 0,14M. Hver fraktion dialyseres øjeblikkeligt mod 0,01M ammoniumacetat i 3 til 4 dage på et køligt sted og lyofiliseres, hvorved der fås et pulver (35 mg) fra fraktion A og et pulver (27 mg) fra fraktion B. Førstnævnte identificeres som den i overskriften anførte forbindelse, og sidstnævnte som en blanding af des-alanin-(B30)-svineinsulin og intakt svineinsulin ved hp væskekromatografi og polyacrylamidgelelektroforese.

(3) Human insulin

Trifluoreddikesyre (2 ml) med anisol (0,2 ml) sættes til det ovenfor opnåede produkt (30 mg), og blandingen holdes ved stuetemperatur i 30 minutter. Trifluoreddikesyren fjernes under nitrogenatmosfære, og blandingen ekstraheres med ether (15 ml) efter tilsætning af 1N eddikesyre (2 ml) til fjernelse af anisolen. Eddikesyrelaget lyofiliseres, hvorved den i overskriften anførte forbindelse fås (28 mg). Udbyttet er 43% beregnet ud fra udgangsforbindelsen i 77% renhed.

Produktet identificeres som den i overskriften anførte forbindelse ved aminosyreanalyse, "Slab" gelelektroforese og hp væske-

kromatografi. Aminosyreanalysen gennemføres under samme betingelser som i afsnit (1), og resultatet er som følger:

Aminosyreanalyse: Lys 1,00 (1), His 1,89 (2), Arg 0,87 (1), Asp 3,32 (3), Thr 3,16 (3), Ser 2,99 (3), Glu 7,35 (7), Pro 1,29 (1), Gly 4,39 (4), Ala 1,26 (1), CysO₃H 4,6 (6), Val 3,93 (4), Ile 1,61 (2), Leu 6,51 (6), Tyr 3,68 (4), Phe 3,19 (3).

Eksempel 2

(1) Desalanin-(B30)-okseinsulin

Til en opløsning af okseinsulin (200 mg) i 0,1M ammoniumhydrogencarbonat (40 ml) sættes krystallinsk carboxypeptidase A (1,8 mg, 49 u/mg). Blandingen holdes natten over ved stuetemperatur og lyofiliseres, hvorved der fås et råt pulver (180 mg) af den i overskriften anførte forbindelse. Man forvisser sig om, at produktet består af 78% af den i overskriften anførte forbindelse og 22% desasparagin-(A21)-desalanin-(B30)-insulin.

(2) [B30-Thr-OBu^t]-okseinsulin

Det under afsnit (1) ovenfor opnåede produkt (116 mg, 5 mM) og L-threonin-t-butylester (448 mg, 500 mM) opløses i en blanding (2,4 ml) af ethanol og dimethylformamid (1:1). Opløsningen blandes med 0,5M boratpufferopløsning (1,6 ml, pH 7,0) indeholdende krystallinsk trypsin (87,5 mg, 0,94 mM) og TPCK (0,27 mg, 0,2 mM) og inkuberes natten over ved 37°C. Fremstillingen af den i overskriften anførte forbindelse bekræftes ved hp væskekromatografi, og udbyttet beregnes til 80%.

Reaktionsblandingen behandles på samme måde som i eksempel 1 (2). Den resulterende fraktion A rekromatograferes for at fjerne desasparagin-(A21)-desalanin-(B30)-insulin og behandles på samme måde som i eksempel 1 (2), hvorved der fås et råt pulver (63 mg). Produktet identificeres som den i overskriften anførte forbindelse ved hp væskekromatografi og "Slab" gelelektroforese.

(3) [B30-Thr]-okseinsulin

Til produktet (63 mg) fra afsnit (2) ovenfor sættes trifluoreddikesyre (2 ml) med anisol (0,2 ml). Blandingen holdes ved stuetemperatur i 30 minutter, behandles så på samme måde som i eksempel 1

(3) og lyofiliseres, hvorved der fås den i overskriften anførte forbindelse (60 mg). Udbyttet er 66% beregnet ud fra udgangsforbindelsen i 78% renhed.

05 Produktet identificeres ved hjælp af [B30-Thr]-okseinsulin fremstillet på en anden måde, ved aminosyreanalyse, "Slab" gelelektroforese og hp væsekromatografi. Aminosyreanalysen gennemføres under samme betingelser som i eksempel 1 (1), og resultatet er som følger:

10 Aminosyreanalyse: Lys 1,00 (1), His 1,95 (2), Arg 0,98 (1), Asp 3,00 (3), Thr 2,00 (2), Ser 2,83 (3), Glu (6,69 (7), Gly 4,06 (4), Ala 2,06 (2), CysO₃H 5,38 (6), Val 4,45 (5), Ile 0,76 (1), Leu 6,14 (6), Tyr 3,92 (4), Phe 2,97 (3), Pro 1,20 (1).

Eksempel 3

(1) [B30-Thr-OBu^t]-svineinsulin

15 Desalanin-(B30)-svineinsulin (100 mg, 10 mM) fremstillet ved fremgangsmåden i eksempel 1 (1) og L-threonin-t-butylester (205 mg, 500 mM) opløses i en blanding af (1,05 ml) af ethanol og dime-thylformamid (1:1, vol./vol.). Opløsningen blandes med en 0,5M borat-pufferopløsning (0,7 ml) og Protease I (0,35 mg) fremstillet med
20 Achromobacter lyticus M497-1 og inkuberes ved ved 37°C i 2 dage. Reaktionsblandingen gøres sur med iseddikesyre og underkastes gel-filtrering med en søjle (4,2 x 130 cm) af "Sephadex G 50" med yderst fine partikler til adskillelse i en enzymfraktion, en insulin-fraktion og en threoninfraktion. Enzymet og L-threonin-t-butyleste-
25 ren genvindes mere end 50%. Insulinfraktionen lyofiliseres, hvorved der fås et råt pulver (83 mg). Pulveret underkastes søjlekromatogra-fi på samme måde som i eksempel 1 (2), hvorved der fås et pulver (48 mg) fra fraktion A og et andet pulver (20 mg) fra fraktion B. Førstnævnte identificeres som den i overskriften anførte forbindelse,
30 og sidstnævnte som en blanding af desalanin-(B30)-svineinsulin og et kontamineret svineinsulin.

(2) Human insulin

35 Det ovenfor opnåede produkt (40 mg) behandles med trifluor-eddikesyre (2 ml) og anisol (0,2 ml). Blandingen holdes ved stue-temperatur i 30 minutter og behandles så på samme måde som i eks-empel 1 (3), hvorved der fås den i overskriften anførte forbindelse

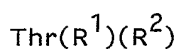
(37 mg). Udbyttet er 56% beregnet ud fra udgangsmaterialet i 76% renhed.

Produktet identificeres som den i overskriften anførte forbindelse ved aminosyreanalyse, "Slab" gelelektroforese og hp væske-kromatografi. Aminosyreanalysen gennemføres under samme betingelser som i eksempel 1 (1), og resultatet er som følger:

Aminosyreanalyse: Lys 1,00 (1), His 1,90 (2), Arg 0,93 (1), Asp 3,21 (3), Thr 3,05 (3), Ser 2,99 (3), Glu 7,23 (7), Pro 1,25 (1), Gly 4,33 (4), Ala 1,25 (1), Val 3,91 (4), Ile 1,58 (2), Leu 6,51 (6), Tyr 3,66 (4), Phe 3,15 (3).

PATENTKRAV:

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et B30-threonin-insulin, KENDETEGNET ved, at man omsætter et des-B30-insulin med et overskud af et threoninderivat med den almene formel:



hvor Thr står for en L-threoninrest, R^1 er hydrogen eller en hydroxybeskyttende gruppe, og R^2 er en carboxylbeskyttende gruppe, i nærværelse af trypsin eller et trypsinlignende enzym og i en reaktionsblanding med en pH-værdi på ca. 5-9 og en temperatur på ca. 0-50°C og indeholdende et vandblandbart organisk opløsningsmiddel, hvorpå den eller de beskyttende grupper fjernes.

25

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, KENDETEGNET ved, at enzymet er trypsin.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, KENDETEGNET ved, at det trypsinlignende enzym er Protease I.

30

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, KENDETEGNET ved, at molforholdet mellem L-threoninderivatet og des-B30-insulinet er 5:1 til 1000:1.

35

5. Fremgangsmåde ifølge krav 4, KENDETEGNET ved, at molforholdet er 25:1 til 200:1.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, KENDETEGNET ved, at det organiske opløsningsmiddel er udvalgt blandt methanol, ethanol, dimethylformamid, dimethylsulfoxid og glycerol.

05 7. Fremgangsmåde ifølge krav 6, KENDETEGNET ved, at det organiske opløsningsmiddel er udvalgt blandt ethanol og dimethylformamid.

10 8. Fremgangsmåde ifølge krav 1, KENDETEGNET ved, at des-B30-insulinet er des-B30-svineinsulin.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 1, KENDETEGNET ved, at des-B30-insulinet er des-B30-okseinsulin.

15 10. Fremgangsmåde ifølge krav 1, KENDETEGNET ved, at threoninderivatet er L-threonin-t-butylester.

20 11. Fremgangsmåde ifølge krav 1, KENDETEGNET ved, at omsætningen gennemføres ved pH 6 til 7.

12. Fremgangsmåde ifølge krav 1, KENDETEGNET ved, at omsætningen udføres ved en temperatur på 20 til 40°C.

Fremdragne publikationer:
