

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 810918 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 810918

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification (IPC⁴)
C07K 7/40

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 25.03.1981

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 25.03.1981

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 28.09.1981

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

27.03.1980 US 134,390

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Eli Lilly and Company, 307 East McCarty Street, Indianapolis, Ind. 46206, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Chance, Ronald Eugene, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Hoffmann, James Arthur, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Insuliinin tuottamismenetelmä.

Förfarande för producerande av insulin.

valmistus
Insuliinin ~~tuottamis~~menetelmä

Mahdollisuuden myötä tuottaa proteiinituotteita rekombinaatti-DNA-menetelmin ja erityisesti tällaisen menetelmän avulla tapahtuvaa insuliinin A-ketjun ja B-ketjun tuottamisen mukana (katso Goeddel et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 76, 106-110 (1979)/ on suuresti lisääntynyt tarve saada tehokas A- ja B-ketjujen yhdistämismenetelmä insuliinin muodostamiseksi.

- 10 Aiempien tutkimusten mukaiset menetelmät, joissa insuliinia tuotetaan yhdistämällä A- ja B-ketjuja, käyttävät lähtöaineina A- ja B-ketjuja niiden stabiilien S-sulfonaattien muodossa. Yleensä A- ja B-ketjujen S-sulfonaatit, joko erikseen tai yhdessä, pelkistetään vastaaviksi -SH-yhdisteiksi, tavallisesti käyttäen suurta ylimäärää pelkistävää tioliyhdistettä. Tuotteet eristetään pelkistävästä väliaineesta ja, jos niitä ei ole yhdessä pelkistetty, tuodaan ne yhdessä hapettavaan väliaineeseen, esim. ilmaan, A- ja B-ketjujen yhdistämiseksi, jolloin saadaan insuliinia. Esimerkkejä tästä menetelmästä löytyy seuraavista julkaisuista, Du et al., Scientia Sinica 10, 84-104 (1961), Wilson et al., Biochim. Biophys. Acta 62, 483-489 (1962); Du et al., Scientia Sinica 14, 229-236 (1965); Kung et al. Scientia Sinica 15, 544-561 (1966); Kexne Tongbao (Republic of China) 17, 241-277 (1966); ja Markussen, J. Acta Paediatrica Scandinavica, Suppl. 270, 121-126 (1977).

- 30 Tämän aloittamistavan muunnokseen sisältyy A-ketju sulfonaatin pelkistäminen, jonka jälkeen pelkistynyt A-ketju reagoi B-ketjun S-sulfonaatin kanssa hapettavassa ilmakehässä. Katso esim. Katsoyannis et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 55, 1554-1561 (1966); Katsoyannis, Science 154, 1509-1514, (1966); Katsoyannis et al. Biochemistry 6, 2642-2655 (1967); US. Patent No 3 420 810; ja Jentsch, Journal of Chromatography 76, 167-174 (1973).

Eräaseen toiseen muunnokseen kytkeytyy A-ketjun SH-yhdisteen osittainen hapettaminen, jotta disulfidi muodostuu A-6 ja A-11 kysteini-tähteiden väliin, jonka jälkeen tuote hapetetaan B-ketjun -SA^H-yhdisteen tai B-ketjun S-sulfonaatin kanssa. Katso esim. Belgialainen Patentti
 5 no 676 069 ja Zahn et al., Liebig's Ann. Chem. 691, 225-231, (1966).

Kussakin aiemmassa, yllä esitetyssä menetelmässä yksi tekijä on yhteinen, se on insuliinin tuottaminen kahden riippumattoman, jaksoittaisen vaiheen kautta, nimittäin
 10 pelkistämällä S-sulfonaatti -SH:ksi, jonka jälkeen hapetetaan -S-S-:ksi.

Dixon et al., Nature 188, 721-724 (1960) kuvaavat olosuhteita, joissa esitetään liuoksessa tapahtuva, yksinkertainen A- ja B-ketjun S-sulfonaattien muuttaminen insuliiniksi käyttämällä tiolia pelkistävänä aineena sekä il-
 15 malla suoritettavaa hapetusta. Yksityiskohdat ovat jokseenkin luonnosmaiset ja saanto, joka perustui ainoastaan takaisin saadun tuotteen aktiivisuuteen, oli 1-2 %. Kuitenkin
 20 Dixon, Proc. Intern. Congr. Endocrinol.:ssa 2. Lontoo 1964, 1207-1215 (1965), hiukan lähempiä tietoja antavassa kirjoituksessa, taulukossa IV sivulla 1211, esittää, että aiemmassa julkaisussa esitettyihin olosuhteisiin kytkeytyvät erilliset hapetus- ja pelkistysvaiheet.

Erotuksena aiempiin menetelmiin nähden on havaittu, että tietyissä reaktio-olosuhteissa on mahdollista saavuttaa insuliinien tai niiden analogien tuotolle S-sulfonoiduista A- ja B-ketjuista hyvät tasot suorittamalla sekä pelkistys- ja hapetusreaktiot yksivaiheisena, yksinkertaisena liuos-
 25 menetelmänä. Keksintö koskee juuri tällaista menetelmää.

Sen tähden, keksinnön kohteena on menetelmä, jossa
 30 insuliinin tai insuliinin analogin A-ketju yhdistetään insuliinin tai insuliinin analogin B-ketjun kanssa insuliinin tai insuliinin analogin tuottamiseksi, jolle menetelmälle

on ominaista, että A-ketjun S-sulfonoitu muoto reagoi B-ketjun S-sulfonoidun muodon sekä pelkistävän tioli-yhdisteen kanssa yhdessä, vettä sisältävässä väliaineessa, olosuhteissa, jotka tuottavat seoksen, jonka (1) pH on
 5 noin 8-12, (2) kokonaisproteiinikonsentraatio on noin 0,1-50 mg/ml ja (3) jonka pelkistävän tioliyhdisteen määrä on sellainen, joka tuottaa kaikkiaan 0,4-2,5 -SH-ryhmää kutakin -SSO₃-ryhmää kohti, joita on kaikkiaan läsnä A- ja B-ketjujen S-sulfonaateissa; ja insuliinin tai sen analogin muodostumisen annetaan tapahtua lämpötilassa, joka on noin
 10 0-25°C ja ympäristössä, joka tarjoaa hapen lähteen.

Keksintö kohdistuu tehokkaaseen, yksivaiheiseen, yhdessä liuoksessa suoritettavaan menetelmään insuliinia tai sen analogin tuottamiseksi sen rakenneosista, S-sulfonoiduista A- ja B-ketjuista.
 15

"Insuliini" termillä tarkoitetaan tietenkin mitä tahansa, luonnossa esiintyvää insuliinia, kuten esim. ihmisen, härän, porsaan, lampaan, kalan, linnun yms., sekä hybridiä, joka on muodostunut yhdistämällä yhden lajin A-ketju
 20 toisen lajin B-ketjun kanssa.

"Insuliinin analogi" nimityksellä tarkoitetaan monenlaisia proteiineja, joissa kussakin on perus-A- ja
 -B-ketju, joka sisältää kaikki puoli-kystiinitähteet samassa jaksollisessa järjestyksessä kuin luonnon insuliineissa.
 25 Analogit eroavat luonnon insuliineista yhden tai useamman aminohappotähteen korvautumisen, lisäyksen, poiston tai muunnoksen suhteen, mutta ne säilyttävät disulfididisidosisjärjestyksen ja ainakin osan insuliinia kaltaisesta aktiivisuudesta. Esimerkkejä sellaisista analogeista ovat
 30 /N-formyyli-Gy¹-A/insuliini, desamino-A¹-insuliini, /sarkosiini¹-A/insuliini, /L-alaniini¹-A/insuliini, /D-alaniini¹-A/insuliini, /isoasparagiini²¹-A/insuliini, /D-asparagiini²¹-A/insuliini, /Arginiini²¹-A/insuliini, /Asparagiiniamidi²¹-A/insuliini, /sarkosiini¹-A, asparagiini²¹-A/insuliini,
 35 /norleusiini²-A/insuliini, /treoniini⁵-A/insuliini, /leusiini⁵-A/insuliini, /fenyylialaniini¹⁹-A/insuliini, /D-tyrosiini¹⁹-A/-

insuliini, /tyrosiini¹⁸-A, asparagiini¹⁹-A, arginiini²¹-A/-
 insuliini, des/B²⁸⁻³⁰-tripeptidi/insuliini, des/B²⁷⁻³⁰-
 tetrapeptidi/insuliini, des/B²⁶⁻³⁰-pentapeptidi/-insuliini,
 des/B²⁷⁻³⁰-tetrapeptidi, tyrosiiniamidi²⁶-B/insuliini,
 5 des/B²⁶⁻³⁰-pentapeptidi, fenyyialaniiniamidi²⁵-B/insuliini,
 des/B¹⁻⁴-tetrapeptidi/insuliini, des/B¹⁻⁵-pentapeptidi/-
 insuliini, /lysiini²²-B/insuliini, /leusiini⁹-B/insuliini,
 /leusiini¹⁰-B/insuliini, des/fenyyialaniini¹-B/insuliini
 yms. Näitä insuliineja ja muita kuvataan kirjallisuudessa;
 10 katso esim. Blundell, T., et al., Advances in Protein
 Chemistry, 26, 330-362, Academic Press, N.Y., N.Y. (1972);
 Katsoyannis, P.G., Treatment of Early Diabetes, 319-327,
 Plenum Publishing Corp. (1979); Geiger, R., Chemiker Zeitung,
 eripainos 100, 111-129, Tontori A. Hiithing, julkaisija,
 15 Heidelberg, Länsi-Saksa (1976); Brandenburg, D et al.,
 Biochem J. 125, 51-52 (1971).

Vaikka keksinnön mukainen menetelmä on laajalti sovel-
 lettavissa insuliinien ja insuliinin analogien tuottamiseen,
 pidetään huomattavasti parempana käyttää sitä luonnossa
 20 esiintyvien insuliinien, erityisesti ihmisen, härän tai
 porsaan ja aivan erityisesti ihmisen insuliinien tuottami-
 seen.

Pantaessa täytäntöön keksinnön mukaista menetelmää,
 A- ja B-ketjun yhdistäminen insuliinin tai insuliinin ana-
 25 login muodostamiseksi voidaan saada aikaan laajalla ketju-
 jen keskinäisen suhteen alueella. Yhdistymistä tietenkin
 | luonnostaan rajoittaa joko A- tai B-ketju, jota on vähemmän
 läsnä. Ainakin, vaikka ei välttämättä, A-ketjun tavanomainen
 | suhde B-ketjuun painon perusteella on noin 0,1-1 - 10:1. On
 30 erittäin suotavaa panna keksinnön mukainen menetelmä täy-
 täntöön käyttäen A-ketjun painosuhdetta B-ketjuun suhteen
 ollessa noin 1:1-3:1. On myös havaittu tällä parempana pi-
 detyllä alueella, että tietyt alueet ovat erittäin edulli-
 sia insuliinin tiettyjen laatujuen tuottamisessa. Täten kun
 yhdistetään A- ja B-ketju ^{härän} insuliinin tuottamiseksi, pidetään

parempana, että A-ketjun suhde B-ketjuun on alueella, joka on noin 1,4:1,0-1,8:1,0. Porsaan insuliinin suhteen parempana pidetty alue on noin 1,0:1,0-1,4:1,0. Mitä ihmisen insuliiniin tulee, parempana pidetty alue on noin 1,8:1,0-2,2:1,0.

Toinen keksinnön mukaisen menetelmän kannalta merkityksellinen parametri on reaktioväliaineen proteiinikonsentraatio. Menetelmä voidaan menestyksellisesti suorittaa proteiinikonsentraatioiden laajalla alueella. Yleensä kuitenkin proteiinikonsentraatio tulee olemaan noin 0,1-50 mg millilitraa kohti reaktioväliainetta. Mieluummin proteiinikonsentraatio tulee olemaan alueella, joka on noin 2-20 mg millilitraa kohti. Jälleen on havaittu tällä viimeksi mainitulla alueella proteiinin optimikonsentraation vaihtelevan riippuen tuotetusta insuliinilajista. Täten porsaan insuliinin suhteen pidetään parempana, että proteiinikonsentraation alue on noin 8-16 mg/ml alueella, kun taas tuotettaessa ihmisen tai härän insuliinia parempana pidetty alue on noin 3-8 mg/ml.

Keksinnön mukainen menetelmä pannaan täytäntöön vetä sisäلتävässä väliaineessa. Huoneenlämpötilassa mitattu pH-alue on yleensä noin 8-12 alueella. Mieluummin se tulee olemaan noin 9,5-11,0 ja optimaalisesti se pidetään noin 10,4-10,6 alueella. Väliaineen pH saatetaan pitää halutulla alueella lisäämällä sopivaa puskuroivaa ainetta. Sellaisia tyypillisiä puskuroivia aineita ovat esim. glysiini, glysyl-glysiini, karbonaatti, tris(hydroksimetyyli)-aminometaani, N,N-bis(2-hydroksietyyli)glysiini, pyrofosfaatti, N-tris(hydroksimetyyli)metyyli-3-aminopropaanisulfo-
nihappo ja muut samankaltaiset aineet, jotka aikaansaavat pH:n säädön edellä kuvatulla alueella. Yleinen ja parempana pidetty puskuroiva aine on glysiini.

Puskuroivan aineen konsentraatio on yleensä noin 0,001M-2M alueella. Mieluummin konsentraatio on noin 0,01M-1M, ja mieluiten se on noin 0,01M-0,1M.

B

A- ja N-ketjut tuodaan yhteen sopivassa, vettä sisältävässä väliaineessa pelkistävän tiolihdisteen läsnäollessa. "Pelkistävällä tiolihdisteellä" tarkoitetaan yhdistettä, jossa on ainakin yksi -SH-ryhmä ja jolla on kapasiteettia saada aikaan A- ja B-ketjujen S-sulfonaattiryhmien pelkistytminen. Vaikka voidaan käyttää mitä tahansa yhdistettä, jolla on nämä ominaisuudet, paljon parempana pidetty pelkistävä tiolihdiste on sellainen, joka hapettuneessa muodossaan on syklisoitu erittäin kestäväksi yhdisteeksi. Pelkistävää tiolihdistettä on läsnä niin paljon että se tuottaa kaikkiaan noin 0,4-2,5 -SH-ryhmää kutakin -SSO₃-ryhmää kohti, joita on kaikkiaan A- ja B-ketjussa, ja mieluummin noin 0,9-1,1 -SH-ryhmää kutakin SSO₃-ryhmää kohti.

Tyypillisten pelkistävien tiolihdisteiden esimerkkejä ovat ditiotreitoli (DTT), ditioerytritoli (DTE), 2-merkaptota-noli, metyyliitioglykolaatti, 3-merkapto-1,2-propaanidioli, 3-merkaptopropionihappo, tioglykolihappo 2-amino-3-merkaptopropioni happo (kysteiini) ja muut sellaiset tiolihdisteet. Parempana pidettyjä pelkistäviä tiolihdisteitä ovat ditiotreitoli ja ditioerytritoli, joista ditiotreitoli on parhaimpana pidetty.

Eräs keksinnön mukaisen menetelmän oleellisista olosuhteista on, että menetelmä suoritetaan hapen lähteen tarjoamassa ympäristössä. Tällaiset olosuhteet voidaan saavuttaa yksinomaan antamalla reaktioseoksen olla avoimena ilmalle. Vaikka saatetaan käyttää suurempaa kosketusmenetelmää, kuten esim. annetaan ilman tai hapen kuplia reaktioseen tai se läpi, sellainen menettely ei ole välttämätön.

Sen tähden, yleensä keksinnön mukainen menetelmä pannaan täytäntöön valmistamalla A-ketjun S-sulfonaatin, B-ketjun S-sulfonaatin sekä pelkistävän tiolihdisteen seos haluttuina konsentraatioina vettä sisältävässä väliaineessa noin pH 8-12. Seosta, joka on kosketuksissa avoimen ilman kanssa, ravistellaan varovasti niin kauan, että se riittää ketjujen kombinaatioon, yleensä ainakin 30 minuutin ajan. Tänä ravistelun aikana seosta pidetään yleensä noin 0-25°C:n

lämpötilassa; mieluummin kuitenkin seosta jäähdytetään kohtuullisesti, jotta lämpötila pysyy tämän lämpötila-alueen alapäässä, yleensä noin 2-10°C:ssa.

Kun reaktiojakso on päättynyt, insuliini ja insuliinin analogi voidaan eristää millä tahansa laajalta alueelta valitulla menetelmällä, joka on tunnustettu insuliinin teknologian alueella. Yleisimmin insuliinin puhdistamiseen käytetyt menetelmät ovat kromatograafisia. Ne ovat helposti sovellettavissa keksinnön mukaisesta menetelmästä tapahtuvaan insuliinin takaisinsaantoon. Niihin kuuluvat geelisuodatus sekä ioninvaihtokromatografia.

Ennen kaikkea tuotteen puhtaus ja aktiivisuus voidaan määrittää tunnustetuin menetelmin kuten esim. polyakryyliamidigeelielektroforeesin, aminohappoanalyysin, insuliinin radioreseptorimäärityksen, insuliinin radioimmunomäärityksen, high performance liquid chromatography (HPLC), ultraviolettispektrin, dansylaation, kalsiinin veren glukosimäärityksen yms. avulla.

Keksinnön mukaisesta menetelmästä saataviin insuliineihin kuuluvat hybridit, jotka sisältävät yhden lajin A-ketjun ja toisen lajin B-ketjun. Keksinnön mukaisen menetelmän paine suuntautuu A- ja B-ketjujen S-sulfonaattien sopivaan yhdistämiseen, ja näiden ketjujen erityinen rakenne, sikäli kuin ne todella edustavat insuliinia tai insuliinin analogin A- ja B-ketjuja, on epäolennainen keksinnön mukaiselle menetelmälle.

Vaikka insuliinin analogia tai insuliinin hybridiä, ts. yhden lajin A-ketjua ja toisen lajin B-ketjua, voidaan valmistaa keksinnön mukaisella menetelmällä pidetään tietenkin parempana liuottaa insuliinia, joka on rakenteellisesti yhtäläinen luonnossa esiintyvän insuliinin kanssa, käyttämällä A-ketjun S-sulfonaattia ja B-ketjun S-sulfonaattia, joiden kummankin aminohapposekvenssi on tällaisessa insuliinissa edustettuna. Ennen kaikkea pidetään huomattavasti parempana käyttää keksinnön mukaista menetelmää

porsaan, härän tai ihmisen insuliinin tuottamiseen ja mieluiten ihmisen insuliinin tuottamiseen.

Insuliinia tai insuliinin analogin A- ja B-ketjuja, kuten jo on esitetty, voidaan saada rekombinantti-DNA-menetelmällä. Niitä voidaan myös valmistaa luonnon insuliineista ja klassisella peptidien synteesimenetelmällä, sekä liuostett^{kiinteä faasi}ä jähmeä vaihe menetelmät mukaan luettuina.

Sekä A- että B-ketjuja pidetään yllä stabiilissa muodossa S-sulfonaatteina, S-sulfonaatti-lähtöaineita voidaan saada hapettavalla sulfitolyysillä, käsittelyllä, jossa A- ja B-ketjut reagoivat natriumsulfiitin kanssa heikosti hapettavan aineen, kuten esim. natriumtetratiooniatin läsnäollessa.

Seuraavat esimerkit on esitetty valaisemaan keksinnön mukaista menetelmää. ~~Nämä esimerkit esitetään ai-
noastaan valaisevassa tarkoituksessa, niitä ei ole tarkoi-
tettu rajoittamaan keksintöä.~~

Poistettava

Esimerkki 1

Porsaan A-ketjuⁿ S-sulfonaattia (360 mg) liuotettiin 36 ml:aan 0,1M glysiinipuskuria (pH 10,5), ja seoksen pH säädettiin 10,5:ksi 5N NaOH:lla. Porsaan B-ketjun S-sulfonaattia (300 mg) liuotettiin 30 ml:aan 0,1M glysiinipuskuria (pH 10,5), ja seoksen pH säädettiin 10,5:ksi 5N NaOH:lla. Ditiotreitolia (DTT) (123,4 mg) liuotettiin 4 ml:aan 0,1M glysiinipuskuria (pH 10,5), ja seoksen pH säädettiin 10,5:ksi 0,2 ml:lla 5N NaOH:a.

A- ja B-ketjujen liuokset yhdistettiin 100 ml:n pullossa, huoneenlämpötilassa ($\sim 25^{\circ}\text{C}$), ja 1,91 ml DTT-liuosta lisättiin, jotta saatiin -SH:n suhteeksi $-\text{SSO}_3$ -een 1,04. Syntyvää liuosta sekoitettiin varovasti avoimessa dekassa, magneettisekoittajaa käyttäen, $4-8^{\circ}\text{C}$:ssa 20 tunnin ajan High performance liquid kromatografia (HPLC) analyysi antoi insuliinin saannoksi 193,8 mg eli 29 % kokonaisproteiinista.

Neljäkymmentä ml tätä lopullista liuosta ^Sjäädettiin pH 3,15:een etikkahapolla. Seos geelisuodatettiin Sephadex G-50 (Superfine) pylväässä (5 x 200 cm), tasapainotettiin ja eluoititiin 1M etikkahapolla 4-8°C:ssa. Insuliinin huippu (eluutiotilavuus noin 2450-2700 ml) poolattiin ja lyofilisoitiin, jolloin takaisinsaanto oli 95 mg insuliinia eli 25 % kokonaisproteiinista. Porsaan insuliinin määritettiin olevan jokseenkin puhdas polyakryyliamidigeelielektroforeesin, aminohappoanalyysin, insuliinin radioreseptorimäärityksen, HPLC:n sekä kaniinin veren glukoosin pelkistämiskokeen perusteella.

Esimerkki 2

Valmistettiin härän A- ja B-ketjujen S-sulfonaattien liuokset, joiden konsentraatiot olivat 5 mg/ml 0,01M glysiinipuskurissa (pH 10,5). Liuosten pH:t säädettiin 10,5:ksi 5N NaOH:lla. DTT (61,7 mg) liuotettiin 4,0 ml:aan 0,1M glysiinipuskuria (pH 10,5), ja pH säädettiin 10,5:ksi 0,15 ml:lla 5N NaOH:a. 0,5 ml:aan B-ketjun liuosta lisättiin 0,8 ml A-ketjun liuosta sekä 0,035 ml DTT-liuosta huoneenlämpötilassa (~25°C), jotta saatiin -SH:n suhteeksi -SSO₃:een 0,91. Syntyvää liuosta sekoitettiin 4-8°C:ssa 20 tunnin ajan avoimessa 3 ml:n vetoisessa pullossa. Seoksen HPLC-analyysi antoi härän insuliinin saannoksi 1,96 mg eli 30 % kokonaisproteiinista.

Esimerkki 3

Valmistettiin porsaan A- ja B-ketjun S-sulfonaattien liuoksia, joiden konsentraationa oli 10 mg/ml 0,1M glysiinipuskurissa (pH 10,5). Kunkin liuoksen pH säädettiin 10,5:ksi 5N NaOH:lla. DTT (61,7 mg) liuotettiin 2,0 ml:aan lasilaitteistossa tislattua vettä. 0,5 ml:aan B-ketjun liuosta lisättiin 0,6 ml A-ketjun liuosta ja 29,25 µl DTT-liuosta huoneenlämpötilassa (~25°C), jotta -SH:n suhde -SSO₃:een oli 1,00. Muodostuvaa liuosta sekoitettiin 4-8°C:ssa avoimessa 3 ml:n pullossa 20 tunnin ajan. Seoksen HPLC-analyysi antoi porsaan insuliinin saannoksi 3,81 mg eli 35 % kokoamisproteiinista.

Esimerkki 4

Valmistettiin ihmisen (haiman) B-ketjun S-sulfo-
naatin ja useita ihmisen (haiman ja E.colia) sekä porsaan
(haiman) A-ketjun S-sulfonaatin liuoksia, joiden konsentraa-
5 tio oli 5 mg/ml 0,1M glysiinipuskurissa (pH 10,5). Kun-
kin liuoksen pH säädettiin 10,5:ksi 5N NaOH:lla. DTT:a
(61,7 mg) liuotettiin 4,0 ml:aan 0,1M glysiinipuskuria
(pH 10,5) ja pH säädettiin 10,5:ksi 0,16 ml:lla 5N NaOH:a.
1,0 ml:aan kutakin A-ketjun S-sulfonaatin liuosta lisättiin
10 0,5 ml B-ketjun S-sulfonaatin liuosta sekä 0,05 ml DTT-liuos-
ta huoneenlämpötilassa (25°C), jotta -SH:n suhteeksi -SSO₃:
een tuli 1,09. Kaikkia liuoksia sekoitettiin viileässä huo-
neessa (4-8°C:ssa), avoimessa pullossa 20-22 tunnin ajan.
Sitten ne analysoitiin HPLC:llä käyttäen ihmisen haiman insu-
15 liinia standardina saantojen laskemiseksi. Tulokset ovat
taulukoituina seuraavat:

Taulukko 1

20	A-ketjun lähde	Ihmisen insuliini, saanto mg	% saanto suhteessa kokonais- proteiiniin
	Porsaan (haiman)	2,00	26,7
	Porsaan (haiman)	2,11	28,1
	Ihmisen (haiman)	1,95	26,0
25	Ihmisen (haiman)	2,03	27,1
	Ihmisen (E.coli)	1,99	26,5

Esim 5 ?



Valmistettiin ihmisen A- ja B-ketjujen S-sulfo-
naattien liuokset, joiden konsentraatio oli 5 mg/ml 0,1M
30 glysiinipuskurissa (pH 10,5). Kunkin liuoksen pH säädet-
tiin 10,5:ksi 5N NaOH:lla. DTT:a (61,7 mg) liuotettiin 4,0
ml:aan 0,1M glysiinipuskuria (pH 10,5), ja pH säädettiin
10,5:ksi 0,16 ml:lla 5N NaOH:a. 0,5 ml:aan B-ketjun liuos-
ta lisättiin huoneenlämpötilassa 1,0 ml A-ketjun liuosta ja
35 sen jälkeen 50 µl DTT:n liuosta, jotta -SH:n suhteeksi

-SSO₃⁻:een saatiin 1,09. Syntyvää liuosta sekoitettiin 4-8°C:ssa, avoimessa 3 ml:n vetoisessa pullossa 22 tunnin ajan, jonka jälkeen HPLC-analyysi antoi ihmisen insuliinia saannoksi 2,58 mg eli 34 % kokonaisproteiinista.

5 Esimerkki 6

Ihmisen A-ketjun S-sulfonaattia (328 mg) liuotettiin 65,6 ml:aan 0,1M glysiinipuskuria (pH 10,5), ja seoksen pH säädettiin 10,5:ksi 75 ml:lla 5N NaOH:a. Ihmisen B-ketjun S-sulfonaattia (164 mg) liuotettiin 32,8 ml:aan 10
10 0,1M glysiinipuskuria (pH 10,5), ja seoksen pH säädettiin 10,5:ksi 15 ml:lla 5N NaOH:a. DTT:a (61,7 mg) liuotettiin 4,0 ml:aan 0,1M glysiinipuskuria (pH 10,5) ja liuoksen pH säädettiin 10,5:ksi 160 µl:lla 5N NaOH:a.

A- ja B-ketjujen liuokset yhdistettiin 150 ml:n vetoisessa lasidekassa, huoneenlämpötilassa (~25°C:ssa), 15 ja siihen lisättiin 3,28 ml DTT-liuosta, jotta -SH:n suhteeksi -SSO₃⁻:een saatiin 1,09. Avoin dekka pantiin jäävesi hauteeseen, viilleään huoneeseen ja sitä sekoitettiin voimakkaasti 30 minuutin ajan. Liuosta sekoitettiin vielä 20 24 tunnin ajan viilleässä huoneessa (4-8°C). Tämä ajan-kohtana HPLC-analyysi antoi ihmisen insuliinin saannoksi 148 mg eli 30 % kokonaisproteiinista.

100 ml:aan tätä liuosta lisättiin 25 ml jäätikkoa, jotta lopulliseksi pH:ksi tuli 3,15. Koko näyte geelisuodatettiin 25 5 x 200 sm:n suuruisessa Sephadex G-50 (Superfine) pylväässä, tasapainotettiin ja eluoiitiin 1M etikkahapolla 4-8°C:ssa. Kaikki eluoitu proteiini lyofilisoitiin. Insuliinin huippu (eluutiotilavuus 2465-2781 ml) painoi 125 mg ja edusti 29,4 %:a takaisin saadusta proteiinista.

30 Osa yllä esitetystä insuliinin huipusta (95,5 mg) liuotettiin noin 9 ml:aan 0,01M tris-0,001M EDTA-7,5M urea-0,03M Nall-puskuria (pH 8,5 4°C:ssa). Seos kromatografoitiin 2,5 x 90 cm:n suuruisen DEAE_E (dietyyliaminoetyyli)-selluloosaioninvaihtopylvään kautta, joka oli tasapainotettu

samassa puskurissa. Proteiini eluoitiin 4-8°C:ssa käyttäen gradienttia, jossa oli 1 litra sekä 0,03M että 0,09M NaCl:a samassa puskurissa, jonka jälkeen seurasi 1 l puskuria, joka sisälsi 1M NaCl:a. Kustakin huipusta suolat
 5 poistettiin Sephadex G-25 pylväässä (course) 2 % etikkahappossa ja lyofilisoitiin. Insuliinin huippu (eluutiotilavuus 878-1008 ml) painoi 55,73 mg ja edusti 84 %:a takaisin saadusta proteiinista.

Sinkki-insuliinikiteet valmistettiin liuottamalla
 10 lasisessa sentrifugiputkessa 11,90 mg insuliinin (DEAE) huipun näytettä 240 μ l:aan 0,1N HCl:a, jonka jälkeen nopeasti lisättiin 2,16 ml 0,04 % $ZnCl_2$ -0,05M natriumsitraatti-15 % asetoniliuosta. Kiteytyminen tapahtui 72 tunnin aikana huoneenlämpötilassa ($\sim 25^\circ C$:ssa), jonka jälkeen superna-
 15 tantti poistettiin ja kiteet pestiin kaksi kertaa kylmällä vedellä, jonka pH oli 6,1, sentrifugoiden pesujen välillä nopeudella 2000 kierrosta minuutissa, $3^\circ C$:ssa. Kiteet liuotettiin uudelleen 0,01N HCl:iin analyysiä varten.

Saatu ihmisen insuliinivalmiste todettiin puhtaaksi
 20 polyakryyliamidigeelielektroforeesin (yksinkertainen vyöhyke), aminohappoanalyysin, insuliinin radioreseptorimäärityksen, insuliinin radioimmunomäärityksen, HPLC:n, dansylaat-
 tion ja UV-spektrin perusteella. USP kaniinilla suoritettu määrittäminen (144 kaniinia) antoi tehoksi $26,3 \pm 1,8$ yksikköä mg:a
 25 kohti (vedetön).

Esimerkki 7

Valmistettiin ihmisen (E.coli) /N-formyyli-Gly¹/A-ketjun S-sulfonaatin ja ihmisen (haiman) B-ketjun S-sulfonaatin liuokset, joiden konsentraatiot olivat 5 mg/ml, 0,1M
 30 glysiinipuskuriin (pH 10,5). Kunkin liuoksen pH säädettiin 10,5:ksi 5N NaOH:lla. DTT:a (61,7 mg) liuotettiin 4,0 ml:aan 0,1M glysiinipuskuria (pH 10,5), ja pH säädettiin 10,5:ksi 0,16 ml:lla 5N NaOH:a. 0,5 ml:aan B-ketjun S-sulfonaatin liuosta lisättiin 1,0 ml /N-formyyli-Gly¹/A-ketjun S-sulfo-
 35 naatin liuosta sekä 0,05 ml DTT-liuosta huoneenlämpötilassa

(25°C:ssa), jotta -SH:n suhteeksi $-SSO_3^-$:een tuli 1,10. Liuosta sekoitettiin viileässä huoneessa (4-8°C:ssa), avoimessa 3 ml:n vetoisessa pullossa 23 tunnin ajan, jonka jälkeen HPLC-analyysi antoi /N-formyyli-Gly¹-A/ ihmisen insuliinin saannoksi 1,46 mg eli 19,5 % kokonaisproteiinista.

Jäätikällä suoritettun pH 3,15:een suoritettun säädön jälkeen osa tätä liuosta geelisuodatettiin 1,5 x 90 cm:n suuruudessa Sephadex G-50 (Superfine) pylväessä, joka tasapainoitettiin ja eluotitiin 1M etikkahapolla 4-8°C:ssa. /N-formyyli-Gly¹A/ ihmisen insuliinin huippu (eluutiotilavuus 87-95 ml) poolattiin, jaettiin eriin ja lyofisoitiin. Tämä proteiini todettiin jokseenkin puhtaaksi HPLC:n ja aminohappoanalyysin perusteella. Radioreseptorimäärityksen perusteella määrätty /N-formyyli-Gly¹-A/ ihmisen insuliinia bivalettiinisuus oli 17 % verrattuna ihmisen insuliinista valmistettuun standardiin.

Esimerkki 8

Valmistettiin porsaan A-ketjun S-sulfonaatin ja ihmisen (E.coli) B-ketjun S-sulfonaatin liuokset, joiden konsentraatio oli 5 mg/ml 0,1M glysiinipuskurissa (pH 10,5). Muodostettiin A-B-seos käyttämällä 2 ml A-ketju-liuosta yhtä millilitraa kohti B-ketju-liuosta A-B-seos säädettiin pH-arvoon 10,5 5N NaOH:lla. Kysteiiniä (121,2 mg) liuotettiin 3,0 ml:aan 0,1M glysiinipuskuria (pH 10,5) ja pH säädettiin arvoon 10,5 0,35 ml:lla 5N NaOH:a. 1,4 ml:aan A-B-seosta lisättiin huoneen lämpötilassa 5 µl kysteiiniliuosta, jotta -SH:n suhteeksi $-SSO_3^-$:een saatiin 0,95, Muodostunutta liuosta sekoitettiin 4-8°C:ssa avoimessa 3 ml:n pullossa 20 tun^{ti}a, jonka jälkeen HPLC-analyysi osoitti saannoksi 3,25 mg ihmisen insuliinia eli 23,2 % proteiinin kokonaismäärästä.

Patenttivaatimukset:

- jolla yhdistetään*
1. Menetelmä *insuliinin tai insuliinin analogin* A-ketjun ja insuliinin tai insuliinin analogin B-ketjun
 5 yhdistämiseksi, *jotta tuotetaan insuliiniⁿ tai insuliinin analogi, ^{n valmistamiseksi} ^{Eiden} t u n n e t t u* siitä, että A-ketjun S-sulfonoitu muoto sekä B-ketjun S-sulfonoitu muoto yhdessä pelkistävän tiolilyhdisteen kanssa reagoivat vettä sisältävässä väliaineessa, *olosuhteissa, jotka tuottavat seoksen, jonka* (1)
 10 pH on *noin* 8-12, (2) kokonaisproteiinikonsentraatio on *noin* 0,1-50 mg millilitraa kohti sekä (3) *jossa* pelkistävän tiolilyhdisteen määrä on *sellainen, että se tuottaa* kaikkiaan *noin* 0,4-2,5 -SH-ryhmää kutakin *-SSO₃-ryhmää kohti,*
 15 *joita on läsnä A- ja B-ketjun S-sulfonaattien kokonais-* määrässä, *ja annetaan insuliinin tai insuliinin analogin* muodostua *pitämällä seosta* noin 0°C-25°C:n lämpötilassa *ja* ympäristössä, joka tarjoaa hapen lähteen.
 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että A-ketjun S-sulfonaatilla sekä B-
 20 ketjun S-sulfonaatilla on aminohapposekvenssi, joka edustaa luonnossa esiintyvää insuliinia.
 3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että A-ketjun S-sulfonaatin painosuhde B-ketjun S-sulfonaattiin on *noin* 0,1:1-10:1.
 - 25 4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että A-ketjun S-sulfonaatin painosuhde B-ketjun S-sulfonaattiin on *noin* 1:1-3:1.
 5. Minkä tahansa patenttivaatimusten 1-4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että proteiinikonsentraa-
 30 tio on *noin* 2-20 milligrammaa millilitraa kohti.
 6. Minkä tahansa patenttivaatimusten 1-5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että reaktioseoksen pH on *noin* 9,5-11,0.

*frumottua**esim. näin:**opäätösmällinen*

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että reaktioseoksen pH on ~~noin~~ 10,4-10,6.

8. Minkä tahansa patenttivaatimusten 1-7 mukainen
menetelmä, t u n n e t t u siitä, että pelkistävää tioli-
⁵yhdistettä on läsnä sellainen määrä, että se liuottaa?
kaikkiaan ~~noin~~ 0,9-1,1 -SH-ryhmää kutakin -SSO₃⁻-ryhmää
| kohti, ~~joita on läsnä~~ A- ja B-ketjujen S-sulfonaattien
kokonaismäärässä.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n -
10 n e t t u siitä, että pelkistävä tiolilyhdiste on ditiotrei-
toli tai ditioerytritoli.

10. Minkä tahansa patenttivaatimusten 1-4 mukainen
menetelmä, t u n n e t t u siitä, että reaktioseosta pide-
tään ~~noin~~ 2°C:n - 10°C:n lämpötilassa.

15 11. Minkä tahansa aiemman patenttivaatimuksen mukai-
nen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että tuotetta^u insu-
liini on härän, porsaan tai ihmisen insuliinia.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että tuotettu insuliini on härän in-
20 | suliniä, A-ketjuⁿ S-sulfonaatin painosuhde B-ketjua S-sulfo-
naattiin on ~~noin~~ 1,4:1,0-1,8:1,0 ja proteiinikonsentraatio
on ~~noin~~ 3-8 milligrammaa millilitraa kohti.

13. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että tuotettu insuliini on porsaan insu-
25 | liinia, A-ketjun S-sulfonaatin painosuhde B-ketjun S-sulfo-
naattiin on ~~noin~~ 1,0:1,0-1,4:1,0 ja proteiinikonsentraatio
on ~~noin~~ 8-16 milligrammaa millilitraa kohti.

14. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että tuotettu insuliini on ihmisen insu-
30 | liinia, A-ketjun ^{S-sulfonaatin painosuhde B-ketjun} S-sulfonaattiin on ~~noin~~ 1,8:1,0-2,2:1,0 ja
proteiinikonsentraatio on ~~noin~~ 3-8 milligrammaa millilitraa
kohti.

4. engl.
iel. teksti

Patentkrav:

1. Förfarande för kombination av A-kedjan av ett insulin eller en insulinanalog och B-kedjan av ett insulin eller en insulinanalog för producerande av ett insulin eller en insulinanalog, k ä n n e t e c k n a t därav, att man reagerar S-sulfonylerade formen av A-kedjan, S-sulfonylerade formen av B-kedjan, och ett tiolreduceringsmedel i ett vattenmedium under förhållanden, vilka alstrar en blandning med (1) ett pH från ca. 8 till ca 12, (2) en total proteinkoncentration av ca. 0,1-50 mg/ml, och (3) en sådan mängd av tiolreduceringsmedel som totalt ger ca. 0,1-2,5 -SH-grupper per varje närvarande -SSO₃⁻-grupp i totala mängden av A- och B-kedje-S-sulfonylater, och tillåter blandandet av insulin eller en insulinanalog att ske genom hållande av blandningen vid en temperatur av ca. 0°C till ca. 25°C och i en omgivning som tillhandahåller en syrekälla.
2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att A-kedje-S-sulfonylatet och B-kedje-S-sulfonylatet vardera har den aminosyresekvens som förekommer i ett naturligt uppträdande insulin.
3. Förfarande enligt patentkravet 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att viktförhållandet A-kedje-S-sulfonylat till B-kedje-S-sulfonylat är ca. 1,1:1 - 10:1.
4. Förfarande enligt patentkravet 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att viktförhållandet A-kedje-S-sulfonylat till B-kedje-S-sulfonylat är ca. 1:1 - 3:1.
5. Förfarande enligt något av patentkraven 1-4, k ä n n e t e c k n a t därav, att proteinkoncentrationen är ca. 2-20 mg/ml.
6. Förfarande enligt något av patentkraven 1-5, k ä n n e t e c k n a t därav, att pH i reaktionsblandningen är ca. 9,5 - 11,0.
7. Förfarande enligt patentkravet 6, k ä n n e t e c k n a t därav, att pH i reaktionsblandningen är ca. 10,4 - 10,6.

8. Förfarande enligt något av patentkraven 1-7, k ä n n e t e c k n a t därav, att tiolreduceringsmedlet är närvarande i en mängd som ger totalt ca. 0,9 - 1,1 SH-grupper per varje närvarande $-SSO_3^-$ -grupp i totala mängden A- och B-kedje-S-sulfonater.
9. Förfarande enligt patentkravet 8, k ä n n e t e c k n a t därav, att tiolreduceringsmedlet är ditiotreitol eller ditioerytritol.
10. Förfarande enligt något av patentkraven 1-4, k ä n n e t e c k n a t därav, att reaktionsblandningen hålls vid en temperatur av ca. 2-10°C.
11. Förfarande enligt något av föregående patentkrav, k ä n n e t e c k n a t därav, att insulinet som framställs är insulin av nötkreatur, svin eller människa.
15. 12. Förfarande enligt patentkravet 11, k ä n n e t e c k n a t därav, att det framställda insulinet är insulin av nötkreatur, att viktförhållandet A-kedje-S-sulfonat till B-kedje-S-sulfonat är ca. 1,4:1:0 - 1,8:1:0, och att proteinkoncentrationen är ca. 3-8 mg/ml.
20. 13. Förfarande enligt patentkravet 11, k ä n n e t e c k n a t därav, att det framställda insulinet är insulin av svin, att viktförhållandet A-kedje-S-sulfonat till B-kedje-S-sulfonat är ca. 1,0:1:0 - 1,4:1,0, och att proteinkoncentrationen är ca. 8 - 16 mg/ml.
25. 14. Förfarande enligt patentkravet 11, k ä n n e t e c k n a t därav, att det framställda insulinet är insulin av människa, att viktförhållandet A-kedje-S-sulfonat till B-kedje-S-sulfonat är ca. 1,8:1,0 - 2,2:1,0 och att proteinkoncentrationen är ca. 3 - 8 mg/ml.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:

FI _____

CH _____

DE _____

DK _____

FR _____

GB _____

NO _____

SE _____

US _____

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron
eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Nature, vol. 188, no 4752, 1960, ss. 721-24

13.2.87 *Rosa Tishchenko*

Allekirjoitus