



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **326247**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 14/62 (2006.01)

C12N 15/57 (2006.01)

C12N 9/48 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12P 1/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20014815	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2000.03.23 PCT/EP00/02571
(22)	Inng.dag	2001.10.03	(85)	Videreføringsdag	2001.10.03
(24)	Løpedag	2000.03.23	(30)	Prioritet	1999.04.09, DE, 19915938
(41)	Alm.tilgj	2001.11.20			
(45)	Meddelt	2008.10.27			
(73)	Innehaver	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Brüningsstrasse 50, 65926 FRANKFURT AM MAIN, DE			
(72)	Oppfinner	Paul Habermann, Rossertstrasse 35, D-65817 Eppstein, DE			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO			

(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for fremstilling av modent insulin eller et modent insulin derivat.
(56)	Anførte publikasjoner	Bio/technology, nov. 1988, s. 1321-1325, Hochuli, E. Et al. EP-A2-3477 WO-A1-9514096
(57)	Sammendrag	

Det er beskrevet en fremgangsmåte for fremstilling av pankreatisk karboksypeptidase B eller en isoform eller et mutein av karboksypeptidase B, hvorved (a) en naturlig eller syntetisk forløperfor-n for karboksypeptidase B uttrykkes sekretorisk i en mikroorganisme, (b) den sekretorisk uttrykkede forløperfor-n renses og (e) den rensede forløperfor-n overføres ved en enzymatisk behandling til den aktive karboksypeptidase B, isoformen eller muteinet derav. Det er videre beskrevet en nukleinsyrekonstruksjon, dens anvendelse i nevnte fremgangsmåten og dens fremstilling, samt en vertscelle, dens fremstilling og anvendelse i fremgangsmåten for fremstilling av pankreatisk karboksypeptidase B eller en isoform eller et mutein derav.

Foreliggende oppfinnelse vedrører fremstillingen av modent insulin eller et modent insulin derivat, hvor en naturlig eller ikke-naturlig forløperform av karboksypeptidase B eller en isoform eller et mutein av karboksypeptidase B enzymatisk omdanner en insulin forløper form til nevnte modent insulin eller et modent insulin derivat.

5

Karboksypeptidase er en gruppe av protein- henholdsvis peptidspaltende sinkholdige enzymer (proteaser), som avspaltes hydrolyttisk ved de enkelte aminosyrene trinnvis fra karboksyterminalen av proteinene henholdsvis peptidene som nedbrytes.

10 Karboksypeptidaser hører følgelig til eksopeptidasene. Animalske karboksypeptidaser dannes for eksempel som forstadier i bukspyttkjertelen (prokarboksypeptidaser) og omdannes i tarmen ved hjelp av trypsin til de aktive formene, her er de av stor betydning for fordøyelsen av peptider, de primære spaltingsproduktene av proteiner. I henhold til substratspesifisiteten skiller man mellom forskjellige karboksypeptidaser.

15 Karboksypeptidase B setter for eksempel fri utelukkende basiske aminosyrer, som arginin, lysin og ornitin. Karboksypeptidaser er hjelpemidler ved sekvensbestemmelsen peptider og proteiner, idet med deres hjelp kan de ved karboksyendene stående aminosyrene identifiseres. Videre kan proteiner skjæres målrettet ved anvendelsen av karboksypeptidase B.

20

Et teknisk eksempel på anvendelsen av karboksypeptidase B er fremstillingen av det viktige farmasøytiske produktet insulin. Fremstillingen av dette peptidhormonet er blant annet beskrevet i den europeiske patentsøknaden EP-A 0 489 780. Derved kommer karboksypeptidase B til anvendelse i et viktig trinn ved omdanningen av med trypsin

25 åpne proinsulinstrukturer.

Karboksypeptidase B, som kommer til anvendelse i slike tekniske fremgangsmåter stammer som regel fra karboksypeptidase B preparater som er kommersielt tilgjengelige. Disse utvinnes fortrinnsvis fra svinebukspyttkjertel (Folk, J.E. Meth.

30 Enzym.: 19, 504, 1970).

Enzymer av animalsk opphav har imidlertid den ulempen at de kan være beheftet med faren for kontaminering med animalske vira. Påvisningen av virusfrihet er omstendelig og inngår som en vesentlig av en faktor i beregningen av fremstillingskostnadene. Når

35 enzymet finner anvendelse i stortekniske fremgangsmåter, som den industrielle insulinfremstillingen, ligger en ytterligere ulempe i høye logistikkostnader for tilveiebringelse og oppbevaring av frosset bukspyttkjertel.

Som alternativ for fremstilling av karboksypeptidase B via ekstraksjonen av pankreasevev foreligger den bioteknologiske utvinningen. Derved finnes det flere kjente fremstillingsmåter, som den direkte intracellulære ekspressjonen eller ekspressjonen over et fusjonsprotein i bakterier, for eksempel i form av et β -galaktosidase-karboksypeptidase B fusjonsprotein (J. Biol. Chem., 267:2575-2581, 1992) eller tilsvarende ekspressjon i gjær. Et ytterligere alternativ til dette er ekspressjonen av et karboksypeptidase B – forstadium, prokarboksypeptidase B, som fra amionsyresekvensen av karboksypeptidase B i tillegg består av en signalsekvens som fører til sekresjon av ekspressjonsproduktet. Egnede ekspressjonssystemer er beskrevet og til dels kommersielt tilgjengelig for *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*, *E. Coli* og gjærene *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula polymorphus* og *Pichia pastoris*.

Forutsetning for anvendelsen av ekspressjonssystemer for fremstilling av karboksypeptidase B er at den i et hvert tilfelle valgte vertsstammen ikke hemmes i sin vekst ved nærværet av aktiv karboksypeptidase B slik at en ekspressjon overhode blir mulig. Vertsstammer som oppviser denne egenskapen er for det meste vanskelig å fermentere, slik at det innstiller seg et dårligere utbytte over rom og tid.

Et problem ved den intracellulære ekspressjonen av karboksypeptidase B (direkte ekspressjon eller som fusjonsprotein) ligger i at proteinet først ikke foreligger i riktig rommelig struktur og følgelig er inaktivt. Det må da under rensing og prosessering foldes *in vitro*. Derved kan det komme til feilfolding, som innvirker negativt på aktiviteten og spesifisiteten av enzymet og som vanskeliggjør anvendelsen i legemiddelfremstilling.

Også fremstillingen av karboksypeptidase B ved sekresjon av den modne, aktive formen av enzymet viser ulemper. Under fermenteringen inaktiveres karboksypeptidase B løpende ved omsetningen med peptidlignende bruddstykker av cellulære bestanddeler eller bestanddeler av næringsmediet, som utgjør substrat, slik at utbyttetap opptrer.

Fra WO9514096 er det kjent å uttrykke pro-CPB i *Pichia pastoris*. Ekspresjonsvektoren som omtales i denne publikasjonen inneholder et signalpeptid for sekresjon av det utrykte peptid.

En vei ut av dette dilemmaet er ekspressjonen og sekresjonen av en inaktiv karboksypeptidase B – form i rommelig korrekt form. Ved omsetning med et enzym

kan fra denne forløperen *in vitro* den aktive karboksypeptidase B fremstilles. "Aktiv karboksypeptidase B" betyr herved en karboksypeptidase B som befinner i naturen, for eksempel karboksypeptidase B fra mennesker eller naturlig forekommende isoformer derav. "Aktive karboksypeptidase B" kan likeledes bety et mutein av den naturlig forekommende karboksypeptidase B, som forekommer ved delesjon, addisjon eller substituasjon av aminosyresekvensen, men hvor den enzymatiske aktiviteten av muteinet imidlertid kvalitativt tilsvarer den enzymatiske aktiviteten av naturlig forekommende karboksypeptidase B. Den nevnte forløperen kan være den naturlige prokarboksypeptidase B eller derivat derav, for eksempel en isoform eller et mutein eller karboksypeptidase B som inaktiveres ved tilsetning av en peptidsekvens. Typen av proteinsekvensen som tilsettes beskrives nærmere nedenfor. Foretrukket er prokarboksypeptidase B eller et derivat derav, idet fra dette proteinet overraskende godt styrbart kan fremstilles det aktive karboksypeptidase B. I tillegg kan prokarboksypeptidase B og de nevnte derivatene derav lagres over lengre tidsrom, mens man ved lagringen av karboksypeptidase B observerer et tap av aktivitet.

De nevnte derivatene av prokarboksypeptidase B inneholder aminosyresekvensen av karboksypeptidase B med tillegg av et N-terminaltilføyet peptid med aminosyresekvensen av et signalpeptid for utslusing av derivatet fra den for ekspressjon anvendte vertsorganismen, eventuelt en hvilken som helst, inntil 100 aminosyre lang aminosyresekvens og en endopeptidase gjenkjenningssekvens, som muliggjør den enzymatiske avspaltningen av det i tillegg tilføyede N-terminal peptidet av karboksypeptidase B – andelen av derivatet. Eksempler på slike endopeptidasegjenkjenningssekvenser er de tilsvarende kjente gjenkjenningssekvensene av trypsin, faktor Xa, elastase, chymotrypsin og kollagenase.

Overraskende ble det i tillegg funnet at prokarboksypeptidase B lar seg omsette med proinsulin og trypsin i en "Eintop"-reaksjon, slik at den nydannede aktive karboksypeptidase B straks gjenkjenner og hydrolyserer de dannede karboksyterminale arginin ved insulin B-kjeden. Den under prosessen dannede karboksypeptidase B er mer aktiv enn slik karboksypeptidase B som lagres på forhånd og deretter tilsettes for omsetning med proinsulin. Det i reaksjonsblandingen tilstedeværende trypsinet tjener ikke bare til aktivering av prokarboksypeptidase B, men skjærer i tillegg også proinsulin spesifikt og bidrar derved til frigivelse av modent insulin.

35

Fra EP347781 er det kjent å fremstille insulin ved hjelp av en kombinasjon av trypsin og karboksypeptidase B.

Aktiveringskinetikken ved trypsin påvirkes overraskende ikke ved addisjonen av en tetra-His-sekvens på N-terminalen av prokarboksypeptidase B eller de nevnte derivatene. Fordelen ved en slik addisjon ligger i at proteinet på denne måten lett kan renses affinitetskromatografisk ved hjelp av nikkkel-gelatkompleksdannelse.

5

Fra Bio/Technology, nov. 1988, side 1321-1325 er det kjent å anvende en peptidsekvens, slik som poly-his, for å muliggjøre affinitetskromatografisk rensing.

Som eksempel uttrykkes cDNA – sekvensen av human, pankreatisk
10 prokarboksypeptidase B. Det er imidlertid klart, at på grunn av den store
sekvenshomologien, så vel på DNA – som også på proteinnivå, mellom det humane
enzymet og de tilsvarende enzymene for eksempel fra storfe, rotter, svin og andre
spesies, som danner pankreasvev, at isteden for den humane DNA-sekvensen, DNA-
15 sekvensen av slike spesies likeledes kan anvendes. Videre kan de tilsvarende DNA som
kode for muteiner av karboksypeptidase B anvendes. Likeledes kan DNA sekvenser
som kode for naturlige eller syntetisk frembrakte isoformer av karboksypeptidase B
eller prokarboksypeptidase B, anvendes. I tillegg kan naturlig alle de ikke-naturlig
forekommende DNA-sekvensene anvendes, som på grunn av den degenererte genetiske
20 kode koder de tidligere nevnte DNA-sekvensene, som på grunn av degenerertheten av
den genetiske koden kan erstatte de tidligere nevnte DNA-sekvensene som koder en
karboksypeptidase B eller prokarboksypeptidase B eller i hvert tilfelle et mutein derivat.

Likeledes som eksempel kan det anvendes det fra firmaet Invitrogen kommersielt
tilgjengelige *Pichia pastoris* ekspressjonssystemet for sekresjon av heterologe proteiner
25 for fremstilling av human prokarboksydase B. Det er klart for fagmannen at også
bakterielle systemer, for eksempel *E. Coli* sekretormutanter, som beskrevet i den
europeiske patentsøknaden EP-A-0 448 093, kan anvendes når man erstatter den der
omtalte hirudinsekvensen med sekvensen av prokarboksypeptidasen. Et ytterligere
alternativ ville være ekspressjonen av humant prokarboksypeptidase B i streptomyceter,
30 som for eksempel beskrevet i den europeiske patentsøknaden EP-A 0 504 798 for
tilfellet ekspressjonen av glutarylamidase.

Likeledes er det klart at ved den stortekniske anvendelsen av fremgangsmåten for
isolering av større mengder enzym kan andre proteintekniske rensetrinn enn beskrevet i
35 eksemplene, som tilhørende teknikkens stand, finne anvendelse.

Følgelig er en gjenstand for oppfinnelsen en fremgangsmåte for fremstilling av modent insulin eller et modent insulin derivat, kjennetegnet ved at:

- (a) en naturlig eller ikke-naturlig forløperform av karboksypeptidase B eller en isoform eller et mutein av karboksypeptidase B uttrykkes sekretorisk i en mikroorganisme,
- 5 (b) den sekretorisk uttrykkede forløperformen renses og
- (c) den rensede forløperformen omdannes ved en enzymatisk behandling til aktiv karboksypeptidase B eller isoformen eller muteinet av karboksypeptidase B, hvor trinn c fortsetter under egnede reaksjonsbetingelser ved tilstedeværelse av en insulin forløper form som omfatter B, C og A kjedene til insulin eller et insulin derivat,
- 10 hvorved det i denne prosessen blir dannet modent insulin eller et modent insulin derivat som blir isolert fra reaksjonsblandingen.

Spesielt en slik fremgangsmåte hvorved den pankreatiske karboksypeptidase B eller en isoform derav stammer fra mennesker, fortrinnsvis en slik fremgangsmåte hvorved den

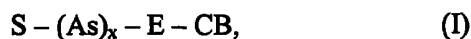
15 naturlige forløperformen tilsvare prokarboksypeptidase B eller en isoform derav.

"Naturlige" og "ikke-naturlige" forløperformer av karboksypeptidase B er slike molekyler som forekommer i naturen ("naturlige forløperformer") eller av slike naturlige forløperformer ved substitusjon, addisjon eller delesjon av aminosyrer

20 dannede ("ikke-naturlig forløperform"), hvorved imidlertid de ikke-naturlige forløperformene ved enzymatisk behandling kan overføres til aktiv pankreatisk karboksypeptidase B eller isoformer eller muteiner derav.

Spesielt foretrukket er en slik fremgangsmåte hvorved den syntetiske forløperformen

25 har følgende struktur:



hvorved

- S er et signalpeptid som bevirker sekresjon, fra den aktuelle mikroorganismen, av fusjonsproteinet dannet under ekspresjonen;
- 30 As er en hvilken som helst genetisk kodbar aminosyre;
- E er en peptid linker bestående av en endopeptidasegenkjenningssekvens;
- CB er aminosyresekvensen til karboksypeptidase B eller en isoform eller et mutein av karboksypeptidase B; og
- x er et helt tall fra 0 til 100.

35

Gjenstand for oppfinnelsen er videre en slik fremgangsmåte hvorved det til den naturlige eller ikke-naturlige forløperformen er tilføyet en peptidsekvens som muliggjør

affinitetskromatografisk rensing av forløperformen, spesielt foretrukket er en slik fremgangsmåte hvorved den for den affinitetskromatografiske rensingen tilføyde sekvensen utgjør 1 til 6, fortrinnsvis 4 histidinrester.

- 5 Gjenstand for oppfinnelsen er likeledes en slik fremgangsmåte hvorved det som mikroorganisme for ekspressjon anvendes gjæren *Pichia pastoris*.

En ytterligere gjenstand for oppfinnelsen er en slik fremgangsmåte hvorved det for enzymatisk behandling anvendes enzymene trypsin, elastase, faktor Xa, chymotrypsin
10 eller kollogenase, fortrinnsvis trypsin.

En nukleinsyrekonstruksjon for anvendelse i en slik fremgangsmåte er en inneholdende en DNA-sekvens som kode for en naturlig eller syntetisk forløperform av karboksypeptidase B eller en isoform eller et mutein av karboksypeptidase B, hvorved
15 den nevnte kodende sekvensen er operativt forbundet med en promotor som muliggjør ekspressjonen av forløperformen i en egnet mikroorganisme. Fortrinnsvis koder DNA-sekvensen for et protein av formel I, og mer foretrukket koder DNA-sekvensen for en naturlig eller syntetisk forløperform av karboksypeptidase B eller en isoform eller et mutein av karboksypeptidase B som også er tilføyet en DNA-sekvens som kode for 1 til
20 6, fortrinnsvis 4 histidinrester.

Nevnte nukleinsyrekonstruksjon kan fremstilles ved at

- (a) de nevnte DNA-sekvensene isoleres eller fremstilles; og
(b) innføres på egnet måte i en vektor.
25 En slik nukleinsyrekonstruksjon kan anvendes i den ovennevnte fremgangsmåte ved fremstilling av pankreatisk karboksypeptidase B.

Nevnte nukleinsyrekonstruksjon kan være inneholdt i en vertcelle, hvorså denne vertcelle kan anvendes i den ovennevnte fremgangsmåte ved fremstilling av pankreatisk
30 karboksypeptidase B.

De foreliggende eksemplene skal anskueliggjøre hvorledes man kan uttrykke å rense prokarboksypeptidase B og (His)₄-prokarboksypeptidase B. Videre beskrives hvorledes prokarboksypeptidase B kan aktiveres med trypsin, og nærmere bestemt så vel i isolert
35 form som også ved kombinert anvendelse av trypsin og prokarboksypeptidase B for fremstilling av insulin.

og den bakoverrettede primeren PPICCPBrev har sekvensen

EcoRI Prokarboksypeptidase

5' TTTTTTGAATTCCTTACTACTAGTACAGGTGTTCCAGGAC 3'
(SEQ ID Nr.: 2)

I en standard PCR reaksjon amplifiseres cDNA med de to primerne og det dannede fragmentet spaltes etter rensing med enzymene XhoI og EcoRI. Det målskorede
10 fragmentet utfelles fra reaksjonsblandingen, opptas i vann og omsettes med det åpne vektorfragmentet i en ligasereaksjon. Kompetentet INV α F' celler transformeres med legeringsblandingen og utplatteres på seleksjonsplater. Kolonier som inneholder det ønskede ekspressjonsplasmid identifiseres som beskrevet ved hjelp av PCR-teknologi. Fra et klonegjenkjent som riktig utvinnes plasmid DNA. Dette DNA innføres som
15 beskrevet av Cregg J.M. et al. i den for histidin auxotrope *P. pastoris* stammen GS115 (Scorer C.A. et al. Biotechnology, 12:181-184, 1994). Kolonier som etter transformasjon er blitt prototrofe for histidin undersøkes med henblikk på ekspressjon av prokarboksypeptidaseproteinet. For dette formålet trykkes 50 kloner som beskrevet av Clare, J.J. et al. (Gene, 105:205-212, 1991). Ved slutten av ekspressjonen uttas 1 ml
20 kulturmedium, cellene frasentrifugeres og den klare supernatanten frysetørkes. Porsjoner av supernatanten analyseres med SDS-polyakrylamidgelelektroforese. Etter Coomassie blåfarging ser man at ved prøven av noen av supernatantene er i området 45000 dt molekylvekt et tydelig bånd synlig som ikke observeres i prøver av supernatanter av ikke-induserte kulturer. Dette båndet erkjennes tydelig i Western Blot
25 analyse av anti-svinekarboksypeptidase B antistoff fra Firmaet Chemicon (bestillingsnr. AB1801). Fraklonet som i dette forsøket ga det beste utbyttet dyrkes i en 2 l krysskolbe en 100 ml kultur som uttrykker prokarboksypeptidase B og isoleres ifølge eksempel 2.

Eksempel 2

30 Eksemplet beskriver rensingen av human prokarboksypeptidase B fra supernatanten av kulturblandingen ifølge eksempel 1. Først frasentrifugeres cellene. Den klare supernatanten blandes deretter med ammoniumsulfat inntil det er oppnådd en ca. 55% metning. Det utfelte proteinet frasentrifugeres og pelleten oppløses i 5 ml av en 50 med
35 mer tris-HCl (pH 7,5) oppløsning inneholdende 1 mM EDTA. Proteinsuspensjonen fraskilles deretter ved hjelp av DEAE – cellulose – kromatografi. Elueringskromatogrammet oppstilles ved hjelp av en 0 til 0,5 M NaCl gradiente.

Fraksjonene som inneholder det ønskede proteinet identifiseres ved hjelp av Western Blot analyse. Fraksjonene forenes og konsentreres ved ultrafiltrering. I retentatet bestemmes proteinkonsentrasjonen ved hjelp av proteinbestemmelse ifølge Bradford. Den derved anrikede prokarboksypeptidasen frysetørkes deretter for lagring eller
 5 aktiveres direkte ifølge eksempel 4 ved trypsinbehandling. Coomassie blåfarging av det gelelektroforetisk fraskilte materialet viser at ca. 60% av materialet finnes i et proteinbånd av ca. 45000 dt molekylvekt. Båndet tilsvarer med det i Western Blot identifiserte området.

10 Eksempel 3

Eksemplet beskriver fremstillingen av ekspressjonsvektoren for syntese av (His)₄ – prokarboksypeptidase B. Konstruksjonen foregår tilsvarende fremgangsmåten beskrevet i eksempel 1. Primeren PPICCPBrev anvendes (se eksempel 1). Den foroverrettede
 15 primeren modifiseres slik at den inneholder fire ytterligere kodoner for histidin. Sekvensen av primeren PCPBHisf lyder tilsvarende:

	XhoI	Prokarboksypeptidase→
20	5'TTTTTCTCGAGAAAAGACACCATCACCACCATCATGGTGGTGAGCAC 3'	
	(His) ₄	(SEQ ID NO.: 3)

Den derved konstruerte *P.pastoris* stammen benyttes for ekspressjon og His-
 25 prokarboksypeptidase B – proteinet renses direkte etter felling med ammoniumsulfat i oppløsning over et nikkelaaffinitetskromatografitrinn. Som kromatografibæremateriale anvendes "ProBond NICKEL Chelating Resin" (Invitrogen katalog nr. R801-01) tilsvarende angivelsene til fabrikanten. Den gelelektroforetiske analysen gir etter Coomassie blåfarging praktisk talt bare et synlig bånd, som oppviser en molekylvekt på
 30 ca. 45000 dt. Dette båndet erkjennes i Western Blot eksperiment av det anvendte antistoffet. Det derved rensede materialet ultrafiltreres og blir etter proteinbestemmelse i henhold til fremgangsmåten ifølge Bradford enten frysetørket for lagring eller aktivert direkte ifølge eksempel 4.

Eksempel 4

5 Eksemplet beskriver aktiveringen av prokarboksypeptidase B ved omsetning med
trypsin. For dette formålet oppløses 22mg frysetørket materiale fra eksempel 2 i 14 ml
av en 0,1 molar Tris-HCl-oppløsning (pH 7,8), oppvarmes til 26°C og blandes med 15
10 µl av en trypsinoppløsning (0,1 U/ml) og inkuberes 3 timer under omrøring. Deretter
blandes oppløsningen med en trypsininhibitor fra soyabønner og trypsinet, inhibitoren,
de fra karboksypeptidase B avspaltede propeptidfragmentene og andre bestanddeler
fraskilles ved mikrofiltrering over en "Centriprep" –filterenhet (firma Amicon) med en
molekylvekts-utelukkelsesgrense på 30000 dt fra karboksypeptidase B. Den aktive
karboksypeptidase B oppbevares frosset i en 5mM Tris-buffer (pH 7,5). Bestemmelsen
av den spesifikke aktiviteten foregår etter bestemmelse av proteinkonsentrasjonen
15 tilsvarende fremgangsmåten til Folk, J.E. (Meth. Enzym., 19:504-508, 1970). Dersom
man går ut fra materialet som ble fremstilt ifølge eksempel 3, så anvendes bare 15 mg
av utgangsmaterialet over aktivering.

Eksempel 5

20 Eksemplet beskriver den kombinerte anvendelsen av trypsin og prokarboksypeptidase B
for fremstilling av insulin fra mono-Arg-insulin. Eksempel 6 av den europeiske
patentsøknaden EP-A 0 347 781 beskriver omsetningen av en mono-Arg-insulin med
trypsin og karboksypeptidase B i et og samme reaksjonskar. I foreliggende eksempel
25 erstattes nå karboksypeptidase B i eksempel 6 av europeisk patentsøknad EP-A 0 347
781 med 15 µg prokarboksypeptidase B fra eksempel 2 av foreliggende søknad hlv.
med 10 µg prokarboksypeptidase B fra eksempel 3 av foreliggende søknad. I begge
reaksjonene forhøyes trypsinkonsentrasjonen ved anvendelse av 3 µl trypsin isteden for
2,5 µl av stammeoppløsningen (ifølge eksempel 6 av europeisk patentsøknad EP-A 0
30 347 781).

P a t e n t k r a v

1.

Fremgangsmåte for fremstilling av modent insulin eller et modent insulin derivat,

5 k a r a k t e r i s e r t v e d a t

(a) en naturlig eller ikke-naturlig forløperform av karboksypeptidase B eller en isoform eller et mutein av karboksypeptidase B uttrykkes sekretorisk i en mikroorganisme,

(b) den sekretorisk uttrykkede forløperformen renses og

(c) den rensede forløperformen omdannes ved en enzymatisk behandling til aktiv

10 k a r b o k s y p e p t i d a s e B eller isoformen eller muteinet av karboksypeptidase B, hvor trinn c fortsetter under egnede reaksjonsbetingelser ved tilstedeværelse av en insulin forløper form som omfatter B, C og A kjedene til insulin eller et insulin derivat, hvorved det i denne prosessen blir dannet modent insulin eller et modent insulin derivat som blir isolert fra reaksjonsblandingen.

15

2.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t pankreatiske karboksypeptidase B eller en isoform derav stammer fra menneske.

20

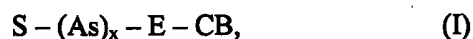
3.

Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den naturlige forløperformen tilsvare prokarboksypeptidase B eller en isoform av prokarboksypeptidase B.

25

4.

Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den ikke-naturlige forløperformen av karboksypeptidase B har følgende struktur:



hvorved

30 S er et signalpeptid som bevirker sekresjon, fra den aktuelle mikroorganismen, av fusjonsproteinet dannet under ekspresjonen;

As er en hvilken som helst genetisk kodbar aminosyre;

E er en peptid linker bestående av en endopeptidasegjenkjenningssekvens;

CB er aminosyresekvensen til karboksypeptidase B eller en isoform eller et mutein av karboksypeptidase B; og

35

x er et helt tall fra 0 til 100.

5.

Fremgangsmåte ifølge et av kravene 1 til 4, k a r a k t e r i s e r t v e d at det til den naturlige eller ikke-naturlige forløperformen er tilføyet en peptidsekvens som muliggjør affinitetskromatografisk rensing av forløperformen.

5

6.

Fremgangsmåte ifølge krav 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at sekvensen tilføyd for affinitetskromatografisk rensing utgjør 1 til 6, fortrinnsvis 4 histidinrester.

10

7.

Fremgangsmåte ifølge et av kravene 1 til 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at mikroorganismen som anvendes for ekspressjon er gjær *Pichia pastoris*.

15

8.

Fremgangsmåte ifølge et av kravene 1 til 7, k a r a k t e r i s e r t v e d at enzymene trypsin, elastase, faktor Xa, kymotrypsin eller kollagenase, fortrinnsvis trypsin, blir anvendt i den enzymatiske behandling.