

(11) Patent numeris: **3328**

(51) Int.Cl.⁵: **C12P 21/04**

(21) Paraiškos numeris: **IP712**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 06 25**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 01 31**

(45) Patent paskelbimo data: **1995 07 25**

(60) SU duomenys: **SU 5001486, 1991 09 04**

(31,32,33) Prioritetas: **40 28 118.3, 1990 09 05, DE**

(72) Išradėjas:
Michael Doerschug, DE
Klaus Peter Koller, DE
Ruediger Marquardt, DE
Johannes Melwes, DE

(73) Patent savininkas:
HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, D-65926 Frankfurt am Main, DE

(74) Patentinis patikėtinis:
Reda Žabollėnė, 7, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:
Insulino gavimo būdas

(57) Referatas:

Aprašomas preproinsulinų aminorūgščių grandinės specifinis hidrolizės būdas, panaudojant klostripaną, susidarant atitinkamiems intermediatams. Šie intermediatai, esant reikalui, paverčiami į atitinkamus insulinus, panaudojant karboksipeptidazę B.

Insulinas susideda iš dviejų polipeptidinių grandinių: A grandinės, kuri sudaryta iš 21 aminorūgšties liekanos, ir B grandinės, kuri sudaryta iš 30 aminorūgščių liekanų. A ir B grandinės sujungtos tarpusavyje dviem disulfidiniais tilteliais - cisteino liekanos A7 ir B7 padėtyse, bei A20 ir B19 padėtyse sujungtos viena su kita. Trečias disulfidinis tiltelis yra tarp A6 ir A11. Gyvulių ir žmogaus insulinai susidaro kasoje preproinsulinų formoje. Pavyzdžiui, žmogaus preproinsulinas susideda iš 24 aminorūgščių liekanas turinčio prepeptido, prie kurio prisijungia proinsulinas, turintis 86 aminorūgščių liekanas. Jo struktūra yra:

Prepeptidas-B-Arg-Arg-C-Lys-Arg-A,

kur C yra grandinė, susidedanti iš 31 aminorūgšties liekanos. Išskiriant iš kasos salelių (Langergenso salelių), prepeptidas atskyla ir susidaro proinsulinas. Galų gale proteolitiškai suskyla C grandinė ir susidaro veiklus žmogaus insulinas.

Genų technologijos metodai vis didėjančiais kiekiais leidžia pagaminti preproinsulinus mikroorganizmuose (EP Nr. A 347781, EP Nr. A 367163). Presekos skaldymas, kaip taisyklė, atliekamas chemiškai ir/arba fermentiniu būdu (DE Nr. P-3440988, EP Nr. A024250). Žinomi fermentiniai metodai yra paremti skaldymu, veikiant tripsinui ir karboksipeptidazei B (Kemmler W ir kt.). Biol. Chem. 24, 678-791 (1971), EP Nr. A 95691, EP Nr. B 89007). Šių metodų trūkumas yra tas, kad susidaro dideli pašalinių produktų kiekiai, kuriuos labai sunku atskirti iš reakcijos tirpalo. Ypatingai paverčiant žmogaus preproinsuliną į žmogaus insuliną (Humaninsulin, HI), gaunamas didelis kiekis Des-Thr (B30) - žmogaus insulino (Des-Thr (B30)-HI). Šis pašalinis produktas nuo HI skiriasi tik tuo, kad HI

nėra galinės aminorūgšties, ir jis labai sunkiai atskiriamas iš reakcijos tirpalo.

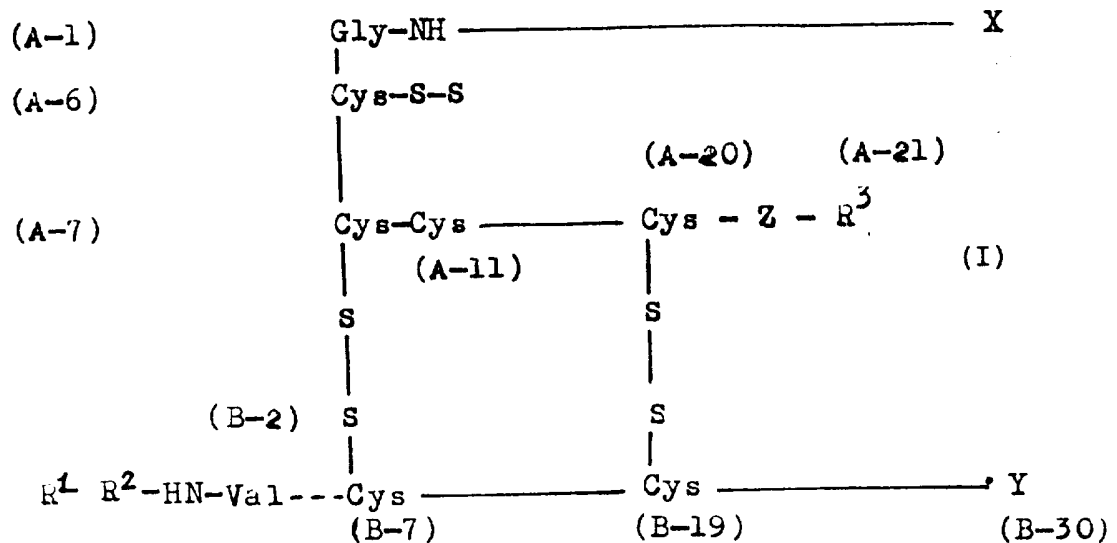
5 Norint sumažinti šio pašalinio produkto susidarymą, gali būti pridedama tam tikrų sunkiųjų metalų, kaip skaldymo priedų, būtent nikelio (EP Nr. A 0264250). Tačiau tokia reakcijos eiga stambiatonažinės gamybos
10 požūriū yra nepageidautina, nes labai užteršiami sunkiaisiais metalais nutekamieji vandenys. Todėl reikia sukurti specifinį ir ekologiškai tinkamą preproinsulino skaldymo metodą.

Klostripanas (klostriopeptidazė B, EC 3.4.22.8) - fermentas, išskiriamas iš *Clostridium histolyticum*
15 kultūros terpės, kurio molekulinis svoris yra apytikriai nuo 30 000 iki 80 000, pasižymi tiek proteolitiniu, tiek ir amidaz-esteraziniu aktyvumu (Mitchell, W.M., Harrington, W.F., J. Biol. Chem.,
243 (18), 4688-4692 (1968)).

20 Jis išsiskiria dideliu specifiškumu Arg-Gly jungčių atžvilgiu. Pavyzdžiui, izoliuotos insulino B grandinės Arg-Gly jungtį klostripanas skaldo 500 kartų greičiau, negu Lys-Ala jungtį, o gliukagone skaldomos tik Arg-
25 Arg, Arg-Ala ir Lys-Tyr jungtys. Šių jungčių hidrolizės greičių santykiai yra 1/7 ir 1/300 (Labouesse, b., Bull. Soc. Chim. Biol., 42, 1293 (1960)).

Netikėtai buvo rasta, kad klostripanas specifiškai
30 skaldo preproinsuliną nuo C-galo už arginino, o aminorūgščių grandinės, esančios už arginino (B22), esančio B-grandinėje, skaldymo nepastebėta.

35 Taigi, išradimas priskiriamas preproinsulino, kurio formulė (I)



kurioje

R^1 yra n aminorūgščių, kur n yra sveikas skaičius ir yra 0 arba 1,

5

R^2 yra vandenilis, chemiškai arba fermentiniu būdu atskeliama aminorūgštis arba peptidas, sudarytas iš 2-10 aminorūgščių liekanų,

10 R^3 yra oksigrupė, aminorūgštis arba peptidas, sudarytas iš 2-10 aminorūgščių liekanų,

15 X yra L-argininas arba peptidas, sudarytas iš 2-45 aminorūgščių liekanų, kurio C-gale arba N-gale yra L-arginino radikalas,

Y yra genetiškai koduojama aminorūgštis,

Z yra genetiškai koduojama aminorūgštis,

20

A1-A20 arba B2-B29 yra gamtinė arba pakeista, pakeičiant vieną arba keletą aminorūgščių, žmogaus arba gyvulio insulino aminorūgščių seka,

aminorūgščių grandinės hidrolizės būdui, kuris skiriasi tuo, kad preproinsulinas hidrolizuojamas, esant klostripanui, ir šiomis sąlygomis paverčiamas insulinu

5 karboksipeptidazės B pagalba.

Peptidų ir proteinų aminorūgščių seka nurodoma nuo aminorūgščių grandinės N-galo. Proteazės hidrolizuoja peptidinę jungtį tarp peptidų arba proteinų

10 aminorūgščių. Klostripanas hidrolizuoja peptidus arba proteinus, turinčius L-argininą esantį už arginino. Preproinsulino hidrolizės reakcijos produktas yra insulino dariniai arba polipeptidai, kurie C-gale turi arginino grupę, arba aminorūgštys.

15 Gamtinėmis aminorūgštimis vadinamos aminorūgštys, pavyzdžiui, Gly, Ala, Ser, Thr, Val, Leu, Ile, Asp, Asn, Glu, Gln, Cys, Met, Tyr, Phe, Pro, Hyp, Trp, Arg, Lys, Hyl, Orn, Cit arba His.

20 Genetiškai koduojamomis aminorūgštimis laikomos aminorūgštys, pavyzdžiui, Gly, Ala, Ser, Thr, Val, Leu, Ile, Asp, Asn, Glu, Gln, Cys, Met, Arg, Lys, His, Tyr, Phe, Trp, Pro arba selenocisteinas.

25 Tinkamiausi yra (I) formulės preproinsulinai, kuriuose R^1 yra fenilalaninas (Phe),

R^2 yra vandenilis, gamtinė aminorūgštis arba

30 peptidas, sudarytas iš 2-30 gamtinių aminorūgščių, kurio C-gale yra L-argininas,

R^3 yra oksigrupė, gamtinė aminorūgštis arba peptidas, sudarytas iš 2-10 gamtinių aminorūgščių,

35 X yra L-argininas arba žmogaus arba gyvulio proinsulino C-grandinė,

- Y yra aminorūgštis iš Thr, Ala arba Ser grupės,
- 5 Z yra aminorūgštis iš Asn, Gln, Asp, Glu, Gly, Ser, Thr, Ala arba Met grupės,
- Al-A20 arba B2-B29 yra žmogaus arba gyvulio insulino aminorūgščių seka.
- 10 Ypatingai tinkami yra (I) formulės preproinsulinai, kuriuose
- R¹ yra Phe,
- 15 R² yra vandenilis arba peptidas, sudarytas iš 2-30 gamtinių aminorūgščių, kurio C-gale yra L-argininas,
- 20 R³ yra oksigrupė, gamtinė aminorūgštis arba peptidas, sudarytas iš 2-10 gamtinių aminorūgščių,
- X yra L-argininas arba žmogaus, kiaulės arba raguočių proinsulino C-grandinė,
- 25 Y yra Thr,
- Z yra Asn,
- 30 Al-A20 arba B2-B29 yra žmogaus, kiaulės arba raguočių insulino aminorūgščių seka.
- Be to, tinkami yra insulinai, kurie buvo siūlyti Vokietijos patentų paraiškose Nr. P 39 19 852 ir Nr. P 40 12 818 0. Pavyzdžiui, InsuArg, kuris turi tokią
- 35 aminorūgščių seką:

5 H₂N-Asp Thr Thr Val Ser Glu Pro Asp Pro Asn Ser Asn
 Gly Arg Phe Val Asn Glu His Leu Cys Gly Ser His
 Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg
 Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Gly Ile Val
 Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
 Leu Glu Asn Tyr Cys Asn-COOH

10 Klostripanas (EC 3.4.22.8) - tai ekstraceliuliarinė
 tiolproteazė iš klostridijų (Clostridien). Fermentas
 yra heterodimeras ir nėra kitų žinomų tiolproteazių
 homologas. Jis yra ypatingai specifiškas jungčių Arg-
 XXX, ypač Arg-Pro, atžvilgiu. Fermentas charakteri-
 zuojamas molekuliniu svoriu nuo 30 000 iki 80 000 ir
 15 izoelektriniu tašku, pH nuo 4,8 iki 4,9. Kaip
 aktyvatoriai veikia, pavyzdžiui, cisteinas, merkapto-
 etanolis, ditiotreitolis arba kalcio jonai.

20 Esant, pavyzdžiui, tozil-L-lizin-chlormetilketonui,
 vandenilio peroksidui, EDTA, Co²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺ jonams arba
 citratui, klostripanas inhibuojamas.

25 Klostripanas gaminamas iš mikroorganizmų fermentacijos
 būdu. Šiame gavimo būde klostridijos (Clostridien)
 kultivuojamos tol, kol maitinančioje terpėje susikaupia
 klostripanas. Tinkamos yra, pavyzdžiui, Clostridium
 histoliticum, būtent Clostridium histoliticum DSM 627.
 Taip pat tinkami yra minėtų mikroorganizmų mutantai ir
 variantai, jeigu jie sintezuoja klostripaną.

30 Auginama anaerobinėse sąlygose individualiai arba
 mišrioje kultūroje, pavyzdžiui, panardinus nejudrioje
 kultūroje, nesant deguonies, arba fermentatoriuose
 azoto, inertinių dujų arba kitų dujų atmosferoje,
 išskyrus deguonį. Fermentacija atliekama nuo 10 iki
 35 45°C, geriausia apytikriai nuo 25 iki 40°C, ypač nuo
 30 iki 38°C temperatūrų intervale. Fermentacija vyksta
 pH srityje nuo 5 iki 8,5, geriausia nuo 5,5 iki 8.

Šiomis sąlygomis kultūriniame buljone po maždaug 1-3 dienų susikaupia pastebimas fermento kiekis. Klostripano sintezė prasideda vėlyvoje log-fazėje ir pasiekia maksimumą standartinėje augimo fazėje.

5 Fermento pasigaminimą galima kontroliuoti, panaudojant aktyvumo testą (Mitchell, W., Meth. Enzymol., vol. 47, p. 165-170, 1977).

10 Klostripano gavimui naudojamame maitinančiame tirpale yra nuo 0,2 iki 6%, geriausia nuo 0,5 iki 3%, organinių azoto junginių bei neorganinių druskų. Organiniais azoto junginiais gali būti: aminorūgštys, peptonai bei mėsos ekstraktai, sumaltos sėklos, pavyzdžiui, kukurūzų, kviečių, pupų, sojos arba medvilnės, alkoholio

15 gamybos distiliacijos atliekos, mėsos miltai arba mielių ekstraktai. Kaip neorganinės druskos maitinančiame tirpale gali būti pavyzdžiui, šarminių arba žemės šarminių metalų, geležies, cinko ir mangano chloridai, karbonatai, sulfatai arba fosfatai, o taip

20 pat ir amonio druskos bei nitratai.

Optimalios fermentacijos sąlygos kiekvienam mikroorganizmui nors ir skiriasi, tačiau jos yra arba žinomos tyrinėtojui, arba gali būti lengvai parenkamos,

25 panaudojant paruošiamųjų bandymų duomenis. Klostripanas gali būti valomas klasikiniiais metodais, pavyzdžiui, nusodinimu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, jonitinės arba gel-skvarbos chromatografijos metodais. Fermentų sujungimas gali būti atliktas pagal žinomus metodus (Colowick ir

30 Kaplan, Meth. Enzymol., vol. XLIV).

Fermentinėje reakcijoje gali būti naudojamos tiek sveikos ląstelės laisvoje arba imobilizuotoje formoje, o taip pat ir išskirtas fermentinis produktas, kuris

35 taip pat gali būti "surištas" su nešikliu (pagrindu).

(I) formulės preproinsulino skaldymas, panaudojant klostripaną, yra atliekamas vandeninėje terpėje, į kurią gali būti pridėta besimaišančių su vandeniu organinių komponentų, kaip pavyzdžiui, alkoholių, ketonų, šlapalo, N,N-dimetilformamido. Tarp kitko, norint geriau kontroliuoti pH, į pradinę reakcijos mišinį gali būti pridėdama atitinkamų organinių arba neorganinių buferių, tokių kaip fosfatas, Tris, glicinas, HEPES ir kt. Preproinsulino koncentracija skaldymo mišinyje yra, pavyzdžiui, 0,01 mg/ml ir 100 mg/ml intervale, geriausia nuo 0,1 mg/ml iki 10 mg/ml. Preproinsulino santykis su klostripanu (mg: aktyvumo vienetai (U)) yra nuo 1:0,01 iki 1:1000, geriausia nuo 1:0,1 iki 1:50.

Reakcijos terpės rūgštingumas gali kisti nuo pH 4 iki pH 12, ypatingai tinkama yra sritis nuo pH 6 iki pH 9.

Laikas, reikalingas suskaldyti preproinsulinui iki atitinkamo intermedio, gali kisti priklausomai nuo reakcijos sąlygų plačiose ribose, pavyzdžiui, nuo 15 minučių iki 48 valandų, geriausia reakciją vykdyti nuo 1 iki 6 valandų.

Prieš naudojant fermentą, jis atitinkamai aktyvuojamas, esant merkaptanui. Merkaptanais laikomi iš esmės visi junginiai, kurie turi SH-grupes; geriausiai tinka DTT, DTE, merkaptoetanolis, tioglikolinė rūgštis arba cisteinas. Merkaptanų koncentracija gali kisti plačiose ribose; geriausiai tinka koncentracijos nuo 0,1 mM iki 100 mM. Toliau, aktyvuojančiame buferyje yra Ca^{2+} - jonai, geriausia CaCl_2 . Aktyvacija vykdoma, esant pH reikšmėms nuo 4 iki 12, geriau nuo pH 6 iki pH 8, ypatingai tinkamos ribos yra nuo pH 7 iki pH 8. pH palaikymui gali būti pridėdama buferinių medžiagų, pavyzdžiui, Tris HEPES, glicino ir kt. Aktyvacijos temperatūra gali būti nuo 0°C iki 60°C, geriau nuo 0°C

iki 10°C, ypatingai tinkamas intervalas yra nuo 0°C iki 5°C. Taip aktyvuotas fermentas gali būti naudojamas tiesiogiai, arba duotose sąlygose iš jo pašalinamas aktyvuojantis buferis, panaudojant chromatografiją per
5 Ultrogelį AcA 202 (®Ultrogel AcA 202).

Skaldant (I) formulės preproinsuliną išradime aprašomu būdu, gaunami insulino dariniai, turintys insulino C-gale arginino liekanas, ir atitinkamos atskeltos
10 aminorūgštys ir/arba peptidai. Esant reikalui, insulino darinius galima paversti į atitinkamus insulinus, panaudojant karboksipeptidazę B. Karboksipeptidazę B galima pridėti į tą patį pradinį reakcijos mišinį kartu su klostripanu, arba aukščiau minėtomis reakcijos
15 sąlygomis galima juos pridėti vienas po kito; be to, insulino darinys minėtomis sąlygomis, prieš pridedant karboksipeptidazę, gali būti išskirtas žinomais metodais, tokiais kaip, pavyzdžiui, chromatografija arba kristalizacija. Karboksipeptidazę B galima naudoti
20 ištirpintoje arba imobilizuotoje formoje. Karboksipeptidazės B ir insulino darinio santykis (pagal svorį) yra apytikriai nuo 1:10 iki 1:5000, geriausia apie 1:500 iki 1:3500 ir ypatingai tinkamas yra apytikriai nuo 1:1000 iki 1:3000.

25 Karboksipeptidazės B ir klostripano santykis (pagal svorį) yra apytikriai nuo 1:1 iki 10:1, geriausia nuo 2:1 iki 5:1.

30 Klostripano ir/arba karboksipeptidazės B skaldymo reakcijos produktai gali, pavyzdžiui, būti nusodinami, sumažinus pH reikšmę, ir/arba išskiriami ir išvalomi, panaudojant žinomus kolonėlių chromatografijos metodus. Taip gautas insulinas gali būti paruošiamas naudojimui
35 įprastomis formomis ir panaudojamas kaip vaistai, gydant diabetą.

Toliau duodamose pavyzdžiuose iš dalies aprašomas išradime siūlomas būdas. Jeigu atskirai nepaminėta, duodami % yra svorio %.

5 **1 pavyzdys**

Clostridium histoliticum DSM 627 kultivavimas buvo atliktas tirpale, kuriame yra:

kazeinpentonas	3%
mėsos ekstraktas	3%
mielių ekstraktas	0,5%
cisteinas	0,05%
KH_2PO_4	0,15%
pH=7,2	

10

Predkultūra (pirminė kultūra) užkrečiama 1% mikroorganizmų. Kultivuojama uždaramame inde anaerobinėmis sąlygomis 37°C temperatūroje 2 dienas. Mikroorganizmų štamai išlaikomi aukščiau minėtame maitinimo tirpale, turinčiame 50% glicerino, -20°C temperatūroje. Fermentatoriuje išskiepijama predkultūra (1%). Išskiepijamo (užkrečiamo) maitinančio tirpalo kiekis fermentatoriuje buvo nuo 10 iki 8 l. Kultivavimas atliekamas, išotinant azotu, 33°C temperatūroje 24 valandas, esant pastoviam pH 7,0. Kultūrinio skysčio išmatuotas fermentinis aktyvumas sudarė 20 000 U/l (Mitchell W., Meth. Enzymol., 47 t., p. 165-170, 1977).

Gautas skystis buvo apdorojamas centrifūguojant ląsteles esant 6000 g, steriliai filtruojant per filtrą, kurio porų dydis buvo 0,22 μm, ir pridėdant 60%-nio ledinio (-20°C) metilo alkoholio į filtratą. Tirpalas išlaikytas 24 valandas -20°C temperatūroje ir vėl centrifūguojamas (8000 g). Nuosėdos tirpinamos

sterilioje terpėje ir vėl centrifūguojama (12 000 g). Fermentinis aktyvumas, išmatuotas nuosėdose, buvo 300 U/ml, 200 U/baltymo mg. Išeiga sudarė 75% išmatuoto fermentatoriuje aktyvumo.

5

2 pavyzdys

Ląstelės buvo praskiestos, kaip aprašyta 1 pavyzdyje.

10 Darbinė terpė fermentatoriuje susidėjo iš:

Penton-proteazė (Difco)	5%
Cisteinas	0,05%
KH ₂ PO ₄	0,15%
pH 7,2	

ir buvo įskiepyta (užkrėta) 2% predkultūros. Klostripano aktyvumas kultūriniame skystyje buvo
15 45 000 U/ml.

Gautas skystis buvo apdirbamas, filtruojant per 0,3 μm membranas (Filtron Omega Membran), norint atskirti ląsteles, ir filtruojant tangentinio srauto
20 (Tangential-Flow) sistemoje per 10 KD membranas, norint sukonzcentruoti ištirpusį klostripaną. Sukonzcentravimo koeficientas buvo 20. Po to, iš koncentrato buvo pašalintos druskos ir chromatografuojama per DEAE-celiuliozę. Klostripano aktyvumas nuo 1000 U/ml, išeiga
25 85%. Preparatas iki panaudojimo buvo laikomas -20°C temperatūroje.

3 pavyzdys

30 A. Klostripano aktyvavimas

12

50 μ l fermentinio preparato (200 U/ml, 286 U/mg) iš
1 pavyzdžio,

1 μ l aktyvuojančio buferio (250 mM DTT, 125 mM CaCl_2)

5

- Kiekis pradiniam mišinyje:

DTT . 5 mM

CaCl_2 2,5mM

- Inkubuojama 2 valandas, šaldant ledu.

10

- Skaldymo reakcijai atlikti fermentas praskiedžiamas
1:40 25 mM Tris/HCl buferiu, pH 7,8.

B. Skaldymo, norint išskirti (B31) Arg-insuliną,
15 klostripano pradinis mišinys

100 μ l Insu-Arg (1 mg/ml)

20 μ l KCl (1 M)

5 μ l Tris/HCl (1 M, pH 7,8)

55 μ l H_2O

20 μ l klostripano (praskiedimas 1:40)

- Kiekis pradiniam mišinyje:

Insu-Arg 0,5 mg/ml

Klostripanas 2,5 U/ml

DTT 12,5 μ M

Tris/HCl 25 mM

KCl 100 mM

CaCl₂

6 μM

5 - Inkubuojama 1-2 valandas 28⁰C temperatūroje, reakciją galima lengvai kontroliuoti aukšto slėgio skystinės chromatografijos (HPLC) pagalba, po to nutraukti, panaudojant tozil-L-lizinchlormetilketoną (TLCK)

- Reakcija nutraukiama, pridedant 1 μl TLCK (15 mM)

10 - Laikoma 4⁰C temperatūroje

Rezultatas: žmogaus insulinas-Arg. Pagal HPLC duomenis, "žmogaus insulinas (DesB30)" nesusidaro.

15 C. Skaldymo, norint išskirti žmogaus insuliną, karboksipeptidazės B pradinis mišinys

200 μl skaldymui skirto klostripano pradinio mišinio, 10 μl karboksipeptidazės B (praskiedimas 1:100)

20 - Karboksipeptidazės kiekis pradiniam mišinyje: 2,5 mg/m

- Inkubuojama 2-4 valandas 28⁰C temperatūroje; reakciją lengvai galima kontroliuoti HPLC chromatografijos pagalba

25 - Karboksipeptidazė B (759 U/ml, 150 U/mg iš kiaulės kasos), skirta reakcijai, praskiedžiama 1:1000 25 mM Tris/HCl buferiu, pH 7,8.

30 Rezultatas: žmogaus insulinas. Medžiaga "insulinas (DesB30)" pagal HPLC duomenis nesusidaro.

D. HPLC-analizė

35 Skilimo kontrolei buvo naudojama kolonėlė RP 18 (0,125 M (NH₄)₂SO₄, su H₂SO₄ nustatomas pH₄, 25-50%

acetonitrilo gradientas) arba kolonėlė C₈ (0,1% TFA, 20-50% acetonitrilo gradientas).

4 pavyzdys

- 5 Klostripanas: 200 U/ml (iš 1 pavyzdžio)
- Aktyvuojantis buferis: 500 mM Tris/HCl, pH 7,8
100 mM DTT
10 25 mM CaCl₂
- Aktyvacija: 100 µl klostripano tirpalo
10 µl aktyvuojančio buferio
- 15 Pradinis mišinys: 35,7 mg žmogaus pre-B-grandis-A-grandis-insulin-sulfonato
315 µl 1 M merkaptoetanolio
105 µl 1 M askorbino rūgšties
100 ml 20 mM glicino buferio, pH 10,7.
- 20 200 µl skaldymui skirto klostripano pradinio mišinio,
10 µl karboksipeptidazės B (praskiedimas 1:100)
- Karboksipeptidazės B kiekis pradiniame mišinyje:
2,5 mg/ml
- 25 - Inkubuojama 2-4 valandas 28⁰C temperatūroje; reakcija lengva kontroliuoti HPLC metodu
- Karboksipeptidazė B (759 U/ml, 150 U/ml, iš kiaulės kasos) praskiedžiama 1:1000 25 mM Tris/HCl buferiu, pH 7,8. Rezultatas: žmogaus insulinas. Medžiaga "insulinas (DesB30)", pagal HPLC duomenis, nesusidaro.
- 35 HPLC-analizė

Skilimo kontrolei buvo naudojama kolonėlė RP 18 (0,125 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, su H_2SO_4 nustatomas pH, 25-50% acetonitrilo gradientas) arba kolonėlė C_8 (0,1% TFA, 20-50% acetonitrilo gradientas).

5

5 pavyzdys

Klostripanas: 200 U/ml (iš 1 pavyzdžio)

10 Aktyvuojantis buferis: 500 mM Tris/HCl, pH 7,8
100 mM DTT
25 mM CaCl_2

15 Aktyvacija: 100 μl klostripano tirpalo
10 μl aktyvuojančio buferio

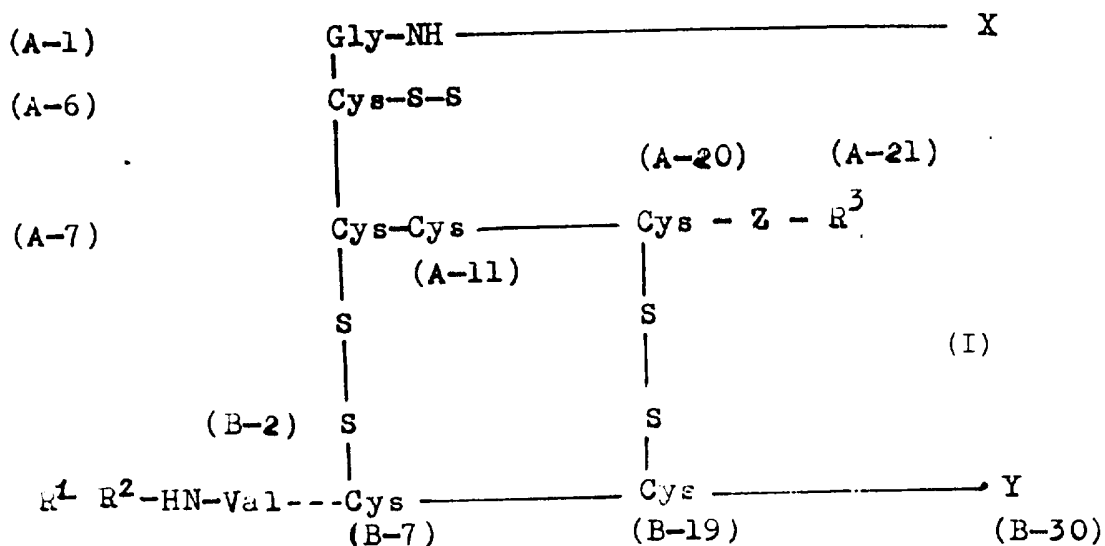
Pradinis mišinys: 35,7 mg žmogaus pre-B-grandis-A-grandis-insulin-sulfonato
315 l l M merkaptioetanolio
20 105 l l M askorbino rūgšties
100 ml 20 mM glicino buferio, pH 10,7

Pradinio mišinio susiformavimas buvo vykdomas per naktį šaldytuve, 4°C temperatūroje, išeiga 0,152 mg/ml.
25 Priemaišos atskiriamos, sumažinant pH reikšmę iki 5,0, po to pridedama Tris iki galutinės koncentracijos 50 mM ir su HCl nureguliuojama pH reikšmę lygi 7,8. Po to buvo pridėta 30 μl fermento tirpalo. Skaldymas atliekamas 30°C temperatūroje ir kontroliuojamas HPLC
30 chromatografijos pagalba.

Rezultatas: aukščiau minėtas preproinsulinas suskyla iki žmogaus insulino Arg. Susidaro minimalus kiekis insulino (DesB30).

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Insulino gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad atlieka preproinsulino, kurio formulė (I):



5 kurioje

R^1 yra n aminorūgščių, kur n yra sveikas skaičius ir yra 0 arba 1,

10 R^2 yra vandenilis, chemiškai arba fermentiniu būdu atskeliama aminorūgštis arba peptidas, sudarytas iš 2-10 aminorūgščių liekanų,

15 R^3 yra oksigrupė, aminorūgštis arba peptidas, sudarytas iš 2-10 aminorūgščių liekanų,

X yra L-argininas arba peptidas, sudarytas iš 2-45 aminorūgščių liekanų, kurio C-gale arba N-gale yra L-arginimo radikalas,

20

Y yra genetiškai koduojama aminorūgštis,

Z yra genetiškai koduojama aminorūgštis,

A1-A20 arba B2-B29 yra gamtinė arba pakeista,
 pakeičiant vieną arba keletą aminorūgščių, žmogaus
 arba gyvulio insulino aminorūgščių seka,
 5 aminorūgščių grandinės hidrolizę, esant klostripanui,
 ir esant reikalui, panaudoja karboksipeptidazę B.

2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
 tuo, kad naudoja (I) formulės preproinsuliną, kuriame

10

R¹ yra fenilas (Phe),

15

R² yra vandenilis, gamtinė aminorūgštis arba
 peptidas, sudarytas iš 2-30 gamtinių aminorūgščių,
 kurio C-gale yra L-argininas,

R³ yra oksigrupė, gamtinė aminorūgštis arba peptidas,
 sudarytas iš 2-10 gamtinių aminorūgščių,

20

X yra L-argininas arba žmogaus arba gyvulio
 proinsulino C-grandinė,

Y yra aminorūgštis iš Thr, Ala arba Ser grupės,

25

Z yra aminorūgštis iš Asn, Gly, Asp, Glu, Gln, Ser,
 Thr, Ala arba Met grupės,

A1-A20 arba B2-B29 yra žmogaus arba gyvulio insulino
 aminorūgščių seka.

30

3. Būdas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n -
 t i s tuo, kad naudoja (I) formulės insulinas,
 kuriuose

35

R¹ yra fenilas (Phe),

- R² yra vandenilis arba peptidas, sudarytas iš 2-30 aminorūgščių, kurio C-gale yra L-argininas,
- R³ yra oksigrupė, gamtinė aminorūgštis arba peptidas, sudarytas iš 2-10 gamtinių aminorūgščių,
- X yra L-argininas, arba žmogaus, kiaulės arba karvės proinsulino C-grandinė,
- Y yra Thr,
- Z yra Asn,
- A1-A20 arba B2-B29 yra žmogaus, kiaulės arba karvės insulino aminorūgščių seka.
4. Būdas pagal vieną arba keletą iš 1-3 punktų, b e - s i s k i r i a n t i s tuo, kad skaldymą atlieka, esant pH reikšmės nuo 4 iki 12, geriausia nuo 6 iki 9.
5. Būdas pagal vieną arba keletą iš 1-4 punktų, b e - s i s k i r i a n t i s tuo, kad (I) formulės preproinsulino koncentracija yra nuo 0,01 mg/ml iki 100 mg/ml, geriausia nuo 0,1 mg/ml iki 10 mg/ml.
6. Būdas pagal vieną arba keletą iš 1-5 punktų, b e - s i s k i r i a n t i s tuo, kad preproinsulino ir klostripano santykis (mg ir aktyvumo vienetų santykis) yra nuo 1:0,01 iki 1:1000, geriausia nuo 1:0,1 iki 1:50.
7. Būdas pagal vieną arba keletą iš 1-6 punktų, b e - s i s k i r i a n t i s tuo, kad reakcijos temperatūra yra nuo 0°C iki +80°C, geriausia nuo +20°C iki +40°C.
8. Būdas pagal vieną arba keletą iš 1-7 punktų, b e - s i s k i r i a n t i s tuo, kad karboksipeptizė B

dalyvauja kartu arba panaudojama po skaldymo klostripanu.

- 5 9. Būdas pagal vieną keletą iš 1-8 punktų, b e s i s -
k i r i a n t i s tuo, kad klostripanas ir/arba
karboksipeptidazė B naudojami imobilizuotoje formoje.