

# Fra gær til krystal

**Ti års arbejde med at modificere insulinmolekylet til udtrykkelse i gærceller har betydet, at Novo Nordisk har fået en væsentlig forbedring af insulin-gæringsudbyttet på deres nye, miljøvenlige fabrik i Kalundborg**

Af Claus Emborg, ce@biocentrum.dtu.dk

Om en snes år skal Novo Nordisk's insulinproduktion holde mere end 100 millioner sukkersyge mennesker i live verden over.

I øjeblikket oplever de industrialiserede lande en årlig stigning på ca. 4% i antallet af sukkersygepatienter og dermed et voksende behov for insulin.

Type 1 sukkersyge rammer oftest i en ung alder. De insulin-dannende celler i bugspytkirtlen ødelægges, og patienterne dør, hvis de ikke får deres daglige insulin.

Type 2 sukkersyge (ikke-insulinkrævende diabetes også kaldet gammelmandssukkersyge) har mere karakter af en kompliceret livsstilssygdom, og behovet for insulinhjælp kommer snigende. Disse patienter bliver der relativt stadig flere af.

## Fremstilling af insulin før og nu

I gamle dage, før gensplejningens tid, ekstraherede man insulin fra svinebugspytkirtler. Svinelagterierne kan slet ikke klare det nuværende behov: i dag bruges der i den industrialiserede del af verden ca. 5000 kg oprenset insulin pr. år. Der kan oprenses ca. 15 mg insulin pr. svinebugspytkirtel, hvilket svarer til ca. 350 mio. svin.

Faktisk er det også begyndt at knibe for den første generation af gensplejningsbaserede gæringsprocesser. Ikke pga. råvareforsyningen (simple landbrugsprodukter og kemikalier), men pga. miljøhensyn. Gæringsprocesser i meget stor skala er vanskelige at håndtere på en miljømæssig tilfredsstillende måde, idet der bruges store mængder vand, strøm osv.

Nordeuropas største biologiske rensningsanlæg, baseret på COD-kapacitet, ligger i Kalundborg, ved Novo Nordisk's største produktionsanlæg.

Her er netop opført en ny fabrik til insulinproduktion, som har kostet 2.5 mia. kr. og har givet en besparelse på 67% mht. eksempelvis vandforbruget.

De 2.5 mia. kr. er direkte projektkomkostninger. De mere end 10 års forsknings- og udviklingsomkostninger, der har skabt grundlaget for tigerspringet, er det sværere at sætte tal på.

## Fremstilling af insulin

### I mennesket

Hverken insulingæren eller insulincellerne i bugspytkirtlen producerer insulin direkte.

Insulinmolekylet består af to helt adskilte peptidkæder (A- og B-kæden), der er bundet sammen af to svovlbroer.

Det er ikke muligt at fremstille en genetisk DNA-kode for molekylet, der kan gensplej ses ind i gæren.

Det humane insulin koder for B-kæden, der efterfølges af et stort C-peptid («connecting peptide»), der forbinder til koden for A-kæden. Foran B-kæden ligger peptidsekvenser, der sørger for transport ind i bugspytkirtlen. Bugspytkirtlen fraspalter enzymatisk C-peptidet, inden insulinet frigøres til blodet.

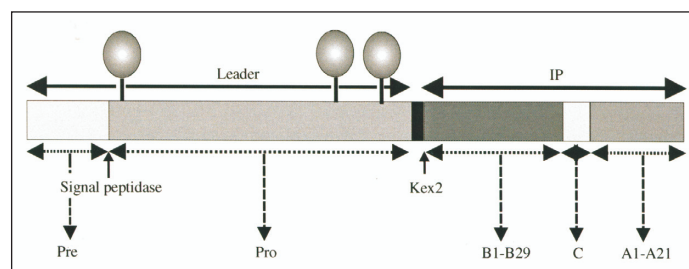
Ved gensplejning

dansk kemi, 84, nr. 8, 2003

I princippet kunne man forestille sig en gensplejset gær gøre det samme som det humane insulinmolekyle, men desværre kan man ikke umiddelbart få gæren til at bruge denne konstruktion. Det gennembrud, der i slutningen af firserne bragte første generation af gærinsulin i produktion, kom, da man opdagede, at C-peptidet sagtens kunne gøres meget mindre og derved mere gærvenligt. Samtidig viste det sig, at et af gærens egne signalpeptider foran et gærhormon, kunne få gæren til at sende den ny specielle insulinprecursor ud i gæringsmediet.

Ved oprensningen blev insulinprecursoren vha. enzymprocesser baseret på trypsin, et enzym der også isoleres fra bugspytkirtlen, omdannet til insulin.

På den ny fabrik produceres der nu anden generation af gensplejset gærinsulin. I figur 1 beskrives elementerne i det møjsommelige gensplejningsprojekt, der har fået gær til at producere meget mere insulinprecursor.



Figur 1. Skematisk præsentation af insulin precursor fusionsproteinet, der udtrykkes i gæren *S. cerevisiae* mhp. produktion af insulin. Insulin tilpasses ekspression i gær ved adaptering af proinsulin, hvor C-peptidet og aminosyren B30 fjernes, og aminosyren B29 forbindes til aminosyren A1 ved et ganske kort C-peptid. Denne enkelt-kædede insulin precursor fusioneres til et leader-peptid. Leaderens funktion er at hjælpe insulin precursoren ind i og gennem gærens sekretoriske vej. Leaderen består af et pre-peptid (signalpeptid) (Pre) og et pro-peptid (Pro). I den sekretoriske vej bliver leaderen først spaltet af enzymet signal peptidase, der fraspalter pre-peptidet og derefter fraspalter enzymet Kex2 endoprotease pro-peptidet, således at insulin precursoren frigives til mediet. Kex2 endoprotease spaltningssstedet er lokaliseret ved pro-peptidets C-terminus, og er på figuren indikeret i sort. Desuden bliver pro-peptidet modificeret ved glycosylering under transporten ud af cellen. Insulin precursor (IP), består af de første 29 aminosyrer af den humane insulin B-kæde (B1-B29) bundet til de 21 aminosyrer af den humane insulin A-kæde (A1-A21) vha. et mini C-peptid (C) mellem lysin<sup>B29</sup> og glycin<sup>A1</sup>. Udbyttet af insulin precursoren, udtrykt i gær, blev forbedret ved en systematisk optimering af leaderen, C-peptidet og af Kex2 endoprotease-spaltning af fusionsproteinet.

### Spaltning af precursor

Samtidig med gensplejningsprojektet er der blevet arbejdet med spaltning af precursor.

Det viste sig, at trypsin i visse tilfælde fraspaltede forkerte steder i insulin. Nye enzymer har løst dette problem.

Insulinprecursoren omdannes ved en enzymproces til insulin midt i oprensningen. Når dette sker, kan man lettere fraseparere de sidste urenheder, idet produktet har skiftet oprensningsegenskaber, hvad urenhederne ikke har.

## Konservativ eller ny teknologi?

Bortset fra det har filosofien bag den ny fabrik været en temmelig konservativ brug af teknologier, der fungerer. Her spiller kvalitetssikringen GMP (Good Manufacturing Practice) ind. I de internationale regler står der, at lægemidler skal være fremstillet ved velkarakteriserede processer, hvilket opfordrer til en vis konservatisme.

Der står imidlertid også, at man skal følge med den teknologiske udvikling, og at der skal foreligge væsentlig dokumentation over for myndighederne, når ændringer foretages.

I 2000 var tiden moden til at påbegynde etablering af den nye fabrik baseret på nye metoder, men også med basis i den allerede anvendte teknologi.

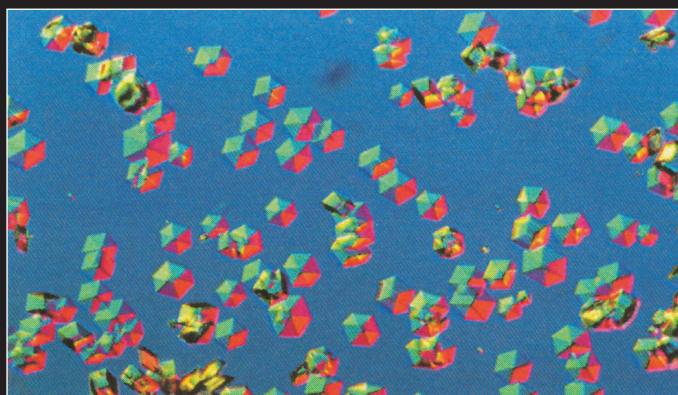
- Det er sket samtidig med, at Novo Nordisk er begyndt at producere nye insulinanaloger, fortæller Thomas B. Kjeldsen, seniorkemiker i forskningsområdet og fortsætter:

- Det drejer sig f.eks. om Asp-B-28, hvor en enkelt aminosyre er skiftet ud, hvorfor man alligevel skulle have et sæt godkendelser på plads. Asp-B-28 optages hurtigere i blodet fra injektionsstedet end human insulin.

Analogerne bruges om dagen. Andre analoger optages lang-sommere. De bruges konstant og er specielt vigtige om natten.

## Integrerede enhedsoperationer sparer tid

I den nye fabrik er gæring og oprensning kommet under samme tag. De enkelte enhedsoperationer i processerne er blevet bedre integreret og koordineret, hvilket har givet færre stop i produkti-



*Fra gær til krystal.*

onsflowet og mindre manuel håndtering.

Også her er der tale om en kvalitetssikringsmæssig GMP-satsning. I den gamle svineinsulinproduktion tog det et insulinmolekyle næsten et år at komme gennem fabrikken. Tiden gik med GMP-karantæner. Efter hver enhedsoperation blev mellemprodukter udfældet og sat i karantæne, indtil kvalitetssikringen gav grønt lys. Det var for at undgå at arbejde videre med et dårligt mellemprodukt.

Den nye fabrik er konstrueret på en ny logistisk tankegang: Det er for dyrt at have hele eller halve års insulinproduktion liggende i karantæne. Derfor integreres enhedsoperationerne med hinanden i blokke, så der er færre stop. Selve gæringen og de første oprensningsprocesser er kontinuerte.

## Fremtidig inhalationsmedicin?

Lige nu er insulin injektionsmedicin, som det har været lige fra insulinbehandlingens start i tyverne. Selvom nålene er blevet tyndere, og sprøjterne er blevet til elegante penne, vil de fleste diabetikere nok ønske at kunne inhalere deres medicin, som mange astmapatienter gør. Produktet er i klinisk afprøvning. Bliver det en succes, vil det stille krav om større produktionskapacitet. Ved injektion er biotilgængeligheden nær 100%. Ved inhalation skal man være glad, bare man kan få noget til at fungere reproducerbart.

En biotilgængelighed på bare 15-20% er en succes.