

984/90

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

1989

54.407/SZE

KIVONAT

U205, COFK 7/40

56857-- A61K 37/26

Emberi inzulin analógok

NOVO-NORDISK A/S, BAGSVAERD, DÁNIA

A bejelentés napja: 1989. 12. 15. (~~PCT/DK89/00296~~)

Elsőbbségei: 1988. 12. 23. (7215/88)

1989. 09. 28. (4777/89)

DÁNIA

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/DK89/00296

A nemzetközi közzététel száma: UO 90/07522

A találmány tárgya ^{céjártás} emberi inzulin analógok, ahol pozitív ^{előállítás}

töltésű aminosav, úgymint Lys vagy Arg található a B-lánc $\lceil \text{Gly}^{\text{B20}} \rceil$ -től számított B28-as és 8-as helyzetében, és ezek további tetszőleges módosítást tartalmaznak a B-lánc C-terminális végén, a $\lceil \text{Phe}^{\text{B24}} \rceil$ -től a C-terminális aminosav származékig, azzal a kikötéssel, hogy a B29 helyen nem Pro van és az A21 és/vagy a B3 különbözik az Asn-től.

5 ábrával, 1 példány "átka" más

led

984/90



A⁹

54.407/SZE

S.B.G. & K.
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI
ÉS SZABADALMI IRODA
1061 BUDAPEST, DALSZÍNHÁZ U. 10.
TELEFON: 153-3733

KÖZZÉTÉTELL
PÉLDÁNY

56857-2

NSUO

COFK 7/40

A 612 37/26

Emberi inzulin analógok

NOVO-NORDISK A/S, BAGSVAERD, DÁNIA

Feltalálók:

BALSCHMIDT Per, ESPERGAERDE,

BRANGE Jens Jørgen Veilgaard, KLAMPENBORG,

DÁNIA

A bejelentés napja: 1989. 12. 15. (~~PCT/DK89/00296~~)

Elsőbbségei: 1988. 12. 23. (7215/88)

1989. 09. 28. (4777/89)

DÁNIA

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/DK 89/00296

A nemzetközi közzététel száma: WO 90/07522



A találmány tárgya

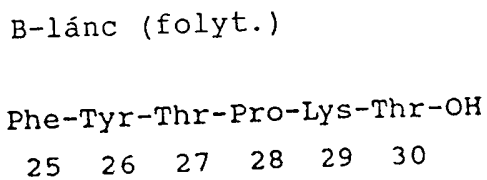
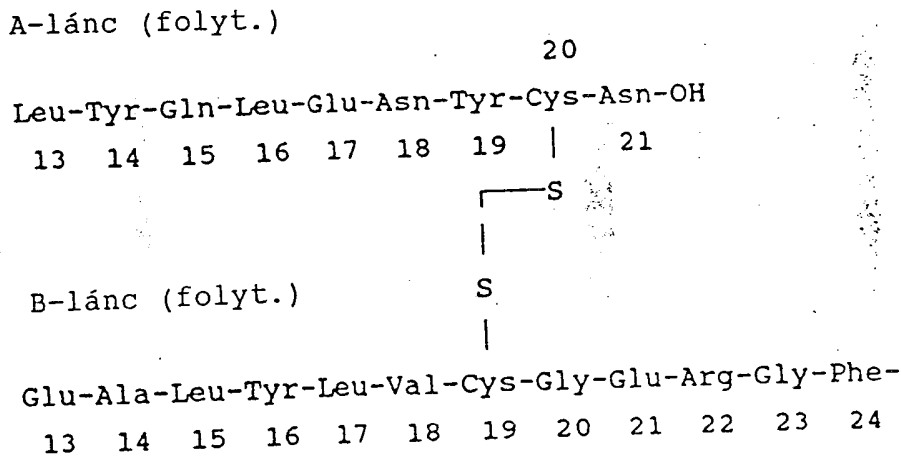
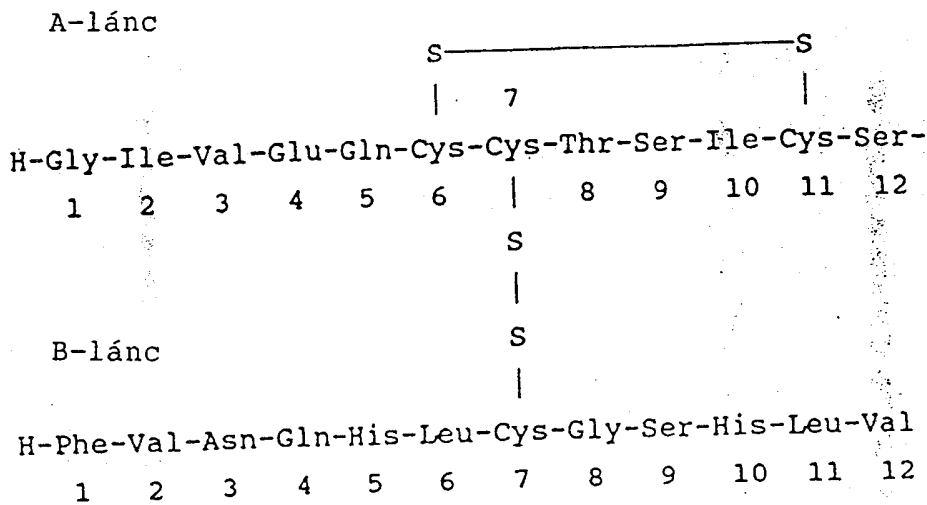
A találmány új emberi inzulin analógokat mutat be, amelyek oldatban csak kis mértékben képesek asszociátumok képzésére, bemutat továbbá ezen inzulin analógok előállítására szolgáló eljárást, a találmány tárgyát képező humán inzulin analógokat tartalmazó inzulin készítményeket és a cukorbetegség (Diabetes mellitus) kezelését ezen inzulin analógokkal.

Irodalmi háttér

Amióta 1922-ben fölfedezték az inzulint, számos különböző típusú inzulin készítményt használtak a cukorbetegség kezelésére. A kezdetben kizárólag gyorsan kezdődő és viszonylag gyorsan megszűnő inzulin aktivitással rendelkező inzulin oldatokat használtak, de később áttértek hosszabb aktivitási tartománnyal bíró készítmények gyártására, amit az inzulin oldhatóságának csökkentésével pl. zink sók és/vagy protaminok hozzáadásával értek el. Az ilyen célokra használt inzulint normál körülmények között a háziállatok hasnyálmirigyéből nyerték ki, a leggyakrabban ökrök, sertések és juhok Pancreas-

ának felhasználásával, de az utóbbi időben biotechnológiai eredetű emberi inzulint tartalmazó készítmények is feltűntek a piacon.

Az emberi inzulin szerkezetét a következő képlet mutatja





Bizonyos háziállatokból származó inzulinok nagyon hasonlóak az emberi inzulinhoz. Így pl. a kutya és a sertés inzulin mindössze abban különbözik az emberi inzulintól, hogy a B-lánc 30. aminosava Ala, a nyúlnál pedig Ser található ugyanebben a pozícióban. Amint azt Morihara és munkatársai a *Nature*, 280. (1979), 412-413. számában és Marcussen (USA szabadalmi szám: 4, 343, 898) leírták, ezek az állati inzulinok a B30-aminosav származék Thr-ra történő kicserélésével átalakíthatók emberi inzulinná.

Amikor egy ilyen inzulint fiziológiás pH értéken föloldanak egy koncentráció függő asszociációs egyensúly keletkezik a monomer, dimer, hexamer sőt nagyobb tagszámú polimerek között. Az egyensúly meghatározható egyebek között ultracentrifugálással, ozmolaritás mérésével vagy a gélszűrés módszerével, amint azt R. Valdes Jr. és G. A. Ackers, a *Methods in enzymology*, 61. (Enzyme structure, part H, eds.: Hirs and Timasheff), Academic Press (1979) 125-142 közleményükben leírták. Az inzulin készítmények normál képleteinél az egyensúly úgy alakul ki, hogy a hexamer forma kerül túlsúlyba.

Az inzulin molekulába különböző szubsztituensek építhetők be azzal a céllal, hogy javuljon az inzulin aktivitásának tartománya a Diabetes kezelése során. A WO 86/05497 számú nemzet-



közi szabadalomban leírták, hogy az inzulin molekulában levő Glu egy vagy több neutrális aminosavval történő helyettesítése oly módon változtatja meg az inzulin kicsapódását, hogy az injekció beadása után lassú felszívódás figyelhető meg.

Továbbá, az EP 214 826 lajstromszámú európai szabadalomban közzétettek inzulin analógokat, amelyek különösen gyorsan abszorbeálódnak az injekció után. Ez a hatás azon a tényen alapul, hogy bizonyos szubsztituációk, melyek az inzulin molekula B9-B12 és a B26-B28 régióiban történnek, szupresszálják az asszociáció irányát, így az inzulin szükségszerűen monomer vagy dimer formában van jelen. Számos ilyen inzulin analóg azonban csökkent biológiai aktivitást mutat.

Az évek során nagy számban írtak le mesterségesen előállított humán inzulin analógokat, rendszerint azzal a céllal, hogy tisztázzák a struktúra aktivitásra gyakorolt hatását. Ilyen közlemény például Marke és munkatársai és Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360. (1979), 1619-1632 által írt cikkek. Az inzulin (B22-B26) szekvenciájában bekövetkező szubsztitúcióknak a receptor kötődésre gyakorolt hatásának vizsgálata különösen érdekes volt, mivel a nevezett szekvenciáról feltételezték, hogy esszenciális az inzulin receptor kötődése szempontjából és mivel a természetben több mutációt találtak ebben a



régióban. Lásd S. Shoelson és munkatársai. PNAS 80. (1983), 7390-7394 és M. Kobayashi és munkatársai, Biomed. Res. 5. (1984), 267-272 közleményeket. Nagyon alacsony biológiai aktivitásokat kaptak azokkal az analógokkal, amelyekben a B24-es Phe vagy a B25-ös Phe aminosavakat helyettesítették, és ezek alapján azt arra következtettek, hogy ennek a két aminosavnak a jelenléte döntő fontosságú a receptor kötődése szempontjából.

Jelen találmány azon a meglepő felismerésen alapul, hogy bizonyos emberi inzulin analógok, amelyekben a Phe^{B24} vagy a Phe^{B25} aminosav származék nincs jelen, gyengén asszociálnak és ugyanakkor a biológiai aktivitásuk nem változott, sőt magasabb, mint az emberi inzulin esetében. Akár a Phe^{B24} akár a Phe^{B25} deléciójának a hatására a Lys^{B29} a B28-as helyzetbe kerül. Ez a pozitív változás az emberi inzulinnak ebben a pozíciójában jelentős a találmány szempontjából.

A találmány összefoglalása

A találmány legszélesebb értelemben vonatkozik az emberi inzulin analógokra, amelyekben pozitív töltésű aminosav, mint pl. lizin (Lys) vagy arginin (Arg) található a B28-as pozícióban, vagyis a B-láncban, a (Gly^{B20})-tól számítva a nyolcadik

helyen.

Ezeknek az inzulin analógoknak meglepően alacsony az asszociációra való hajlamuk, ugyanakkor a fizikai stabilitásuk megnövekedett más, alacsony asszociációs hajlamú inzulin analógokhoz képest. Pozitív töltés bevitele a B28-as helyzetbe két úton történhet. Vagy ki kell ejteni az emberi inzulin B24, B25, B26, B27 vagy a B28 helyeien található aminosav származékát, ami egy olyan emberi inzulin analóghoz vezet, amelyben a B28 pozícióban lizin van, vagy a humán inzulin B28 helyén lévő prolint kell helyettesíteni lizinnel vagy argininnel. Ha a B28-as helyen arginin beépítése a cél akkor a B24, B25, B26, B27 és a B28 helyeken lévő aminosavak kiejtését lehet kombinálni az eredeti (Lys^{B29}) aminosav argininnal történő helyettesítésével.

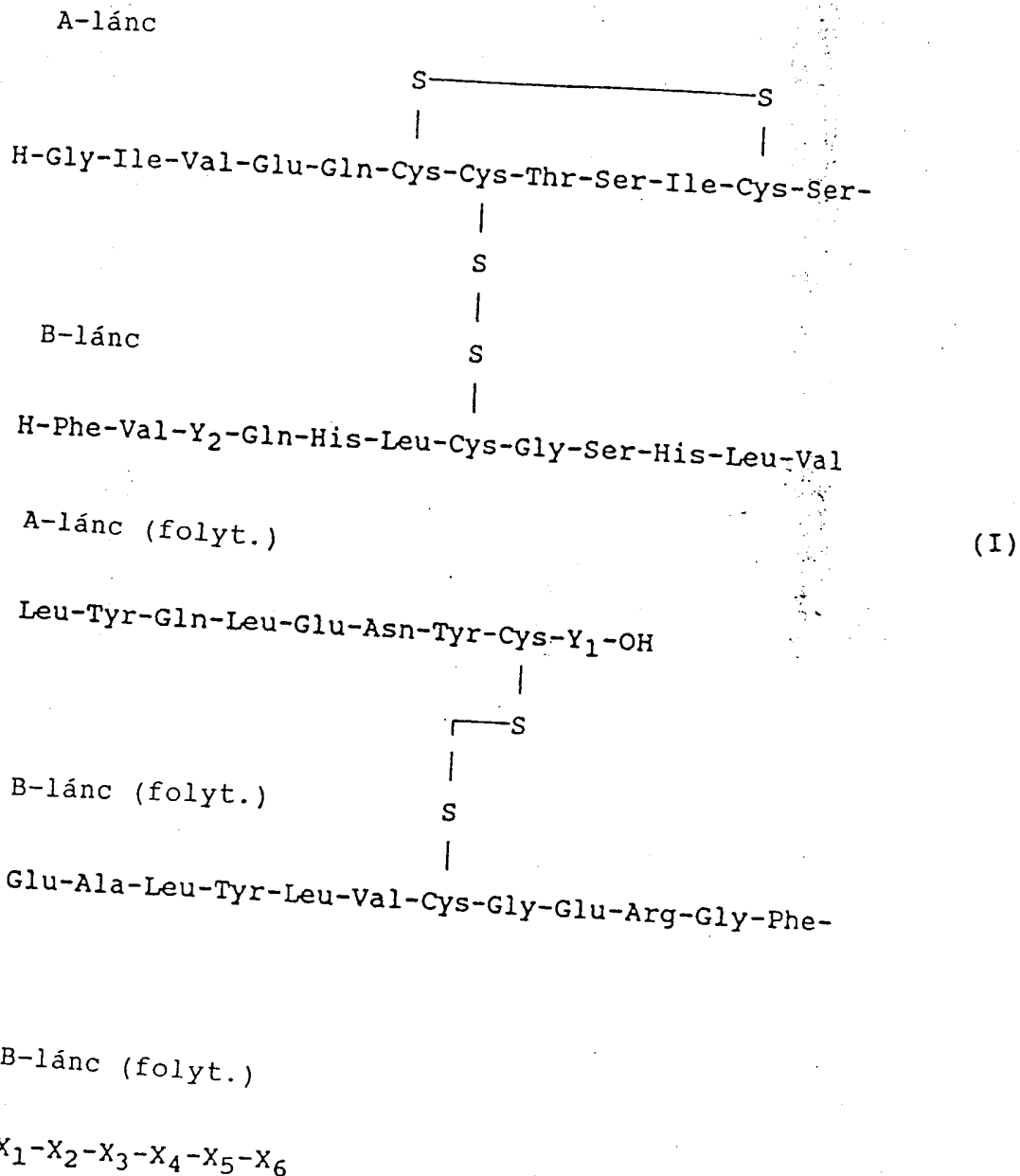
A jelen emberi inzulin analógok tartalmazhatnak továbbá egy vagy több módosítást is a B-lánc C-terminális végén. Így a B25 és B27 pozíciókban lévő, valamint a Lys^{B28} vagy Arg^{B28} aminosavakat követően lehetnek tetszőlegesen választott, a természetben előforduló aminosavak, vagy akár a B29 vagy B30, esetleg mindkettő hiányozhat is.

A jelen találmány egyik pontja szerint a Tyr^{B26} helyettesíthető egy másik, töltéssel nem rendelkező aminosav száрма-

zékkel is, amelynek oldalláncában a második szénatom (C γ) sp² hibridállapotban van (a kötések síkban helyezkednek el).

Szintén azzal a céllal, hogy stabilizálják a molekulát a kémiai degradációval szemben, helyettesíthetik az A21 és/vagy B3 pozícióban lévő Asn-t egy másik aminosav származékkal.

A jelen emberi inzulin analógok a következő képlettel jellemezhetőek (I-es képlet):



ahol az X_1 , X_2 , X_3 , X_5 , Y_1 és Y_2 lehet bármely, a természetben előforduló aminosav származék, az X_4 Lys vagy Arg, X_6 bármely természetben előforduló aminosav származék, amely C-terminális hidroxil csoportot vagy -OH-t tartalmaz vagy az X_5 és az X_6 együtt képezik a C-terminális hidroxil csoportot.

A találmány megvalósításakor az X_5 lehet bármilyen a természetben előforduló aminosav származék, kivéve a prolint.

A fenti képletben szereplő Y_1 és/vagy Y_2 egy megvalósításakor lehet bármilyen természetben előforduló aminosavszármazék, kivéve az aszparagint.

A fenti (I) képlet esetében

az X^1 specifikusan lehet Phe, Ala, His, Thr, Ser, Asn vagy

Tyr,

az X_2 specifikusan lehet Tyr, Thr, Glu, Asp, Ala, His, Ser

vagy Phe,

az X_3 specifikusan lehet Pro, Glu, Asp, Ser, Thr vagy His.

az X_5 specifikusan lehet Lys, Thr, Ser, Ala, Asp vagy Glu,

az X_6 specifikusan lehet Thr-OH, Ser-OH, Ala-OH, Asp-OH,

Glu-OH vagy -OH,

az Y_1 lehet Asn, Glu, Asp, His, Ser, Thr, Val, Leu, Ile,

Ala, Met, Trp, Tyr, Gln vagy Gly, de ajánlato-

sabb Glu, Asp, Glu vagy Ala,

az Y_2 lehet Asn, Glu, Asp, His, Ser, Thr, Val, Leu, Ile, Ala, Met, Trp, Tyr, Gln vagy Gly, de ajánlatosabb Glu vagy Asp.

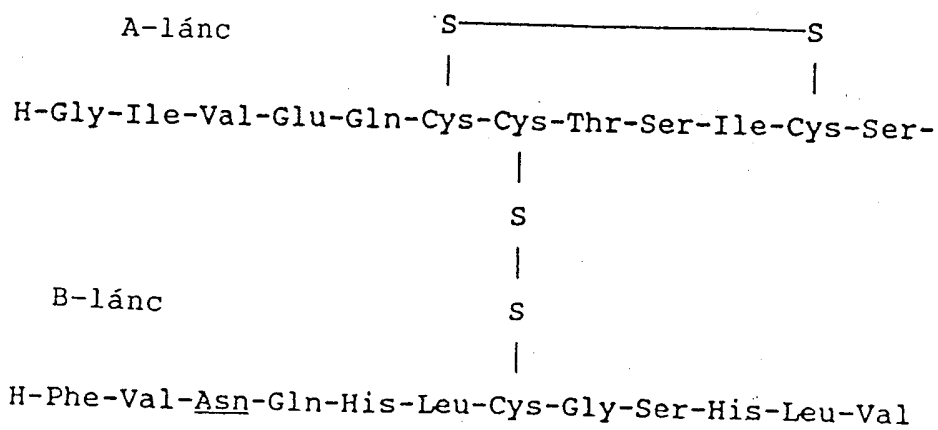
Az emberi inzulin analógok egy csoportja jellemezhető az-
zal, hogy a B24 és B25 helyzetekben eltávolított aminosav
származékokat követő, B26 aminosav származékot helyettesítik
egy másik, semleges töltésű aminosavval, amelyben a γ -hely-
zetben levő szénatom sp^2 hibridállapotban van, valamint azzal,
hogy az A21, B3 és B30 helyeken lévő egy vagy több aminosav
származék különbözik az emberi inzulin megfelelő helyein ta-
lálható aminosavaktól, továbbá azzal, hogy a B30 pozícióban
nincs aminosav származék.

Egy egyszerűbb meghatározás alapján, analógok azok a pep-
tidek, amelyekben az emberi inzulin Tyr^{B26} pozíciója hiányzik,
amelyekben a Phe^{B25}-ot tetszőleges semleges töltésű aminosav
helyettesíti, amelyben a γ -helyzetben lévő szénatom sp^2 hibrid-
állapotban van, amelyekben a A21, B3 és B30 helyeken levő ami-
nosav származékok közül egy vagy több különbözik az emberi in-
zulin aminosav származékaitól és amelyekben a B30 pozícióban
nincs aminosav származék.

A semleges töltésű aminosav, amelyben a C_γ sp^2 hibridáll-
potban van lehet Tyr, Phe, His, Trp és Asn.

A fent említett emberi inzulin analógok esetében lehetséges további helyettesítéseket és módosításokat is végrehajtani, amennyiben a tulajdonságok nem változnak meg lényegesen. Ilyen további módosítások lehetnek például a karboxil csoportok észterezése vagy amidálása, az amino vagy hidroxil csoportok alkilezése vagy a karboxamid csoportok deaminálása. További szubsztitúció lehet a Thr^{A8} His-re vagy a His^{B10} Asp-ra történő kicserélése. Lehetséges még hozzáadni vagy eltávolítani egy vagy néhány aminosav származékot elsősorban a B-lánc C- és/vagy N-terminális végéhez.

A találmány tárgyát képező emberi inzulin analógok egyik csoportjának az alábbi (II) képletben bemutatott szerkezete van, ahol az X jelentése Tyr, His, Phe vagy Asn, az Y pedig Thr, Ser, Ala, Asp vagy Glu vagy egy deléció és ahol tetszőlegesen egyik vagy mindkét aláhúzott Asn-t szubsztitúcióval, deaminálással Asp-ra változtatják, illetve az A-láncban az aláhúzott Asn lehet Gly.



A-lánc (folyt.)

Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn-OH

(II)



B-lánc (folyt.)

S



Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-

B-lánc (folyt.)

X-Thr-Pro-Lys-Y-OH

A találmány szerint leginkább preferált emberi inzulin analógok a következők:

des[Phe^{B25}]-emberi inzulin

des[Tyr^{B26}]-emberi inzulin

des[Thr^{B27}]-emberi inzulin

des[Pro^{B28}]-emberi inzulin

des[Phe^{B25}]-sertés inzulin

des[Pro^{B28}]-sertés inzulin

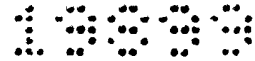
des[Pro^{B28}]-nyúl inzulin

des[Phe^{B25}], des[Thr^{B30}]-emberi inzulin

des[Tyr^{B26}], des[Thr^{B30}]-emberi inzulin

[Ser^{A21}]-des[Pro^{B28}]-emberi inzulin
[Gly^{A21}]-des[Pro^{B28}]-emberi inzulin
[Gly^{A21}]-des[Phe^{B25}]-emberi inzulin
[Asp^{A21}]-des[Phe^{B25}]-emberi inzulin
[His^{B25}]-des[Tyr^{B26}], des[Thr^{B30}]-emberi inzulin
[Asn^{B25}]-des[Tyr^{B26}], des[Thr^{B30}]-emberi inzulin
[Asp^{A21}]-des[Phe^{B25}], des[Thr^{B30}]-emberi inzulin
[Asp^{B28}]-des[Phe^{B25}]-emberi inzulin
[Asp^{B3}]-des[Phe^{B25}]-emberi inzulin
[Lys^{B28}]-emberi inzulin
[Lys^{B28}, Thr^{B29}]-emberi inzulin
[Arg^{B28}]-des[Lys^{B29}]-emberi inzulin

A találmány tárgyát képező emberi inzulin analógok előnyösen használhatók a Diabetes kezelésére, mivel csökkent asszociációs képességük révén gyorsabban szívódnak fel a véráramba, mint a közönséges inzulin, nemcsak az általánosan használt bőr alá adott injekció esetében, hanem non-parenterális használat esetén is, amint azt a Nemzetközi Szabadalmi Közlönyben a WO87/06137 számú szabadalomban is leírják. Megnövekedett fizikai stabilitásuk is előnyösebbé teszi őket a cukorbetegség kezelésében.



A találmány tárgyát képező inzulin analógok a proinzulin gén átalakításával állíthatók elő, mégpedig oly módon, hogy az eredeti humán proinzulin génben a megfelelő helyen kicserélik a kodon(oka)t a kívánt aminosav származékot kódoló bázis triplet(ek)re és/vagy kiejtik a kívánt kódoló rész(eke)t. Alternatív megoldásként, a kívánt inzulin analógot kódoló egész DNS szekvenciát lehet szintetizálni. A kívánt inzulin analógot kódoló gént azután egy megfelelő expressziós vektorba klónozzák, amelyet egy alkalmas gazdába, baktériumba, pl. E. coli-ba, Bacillus-ba vagy élesztőbe transzformálják, ami termeli a várt terméket. A megtermelt peptidet ezután a sejtekből vagy a fermentációs táptalajból nyerik ki, attól függően, hogy az expresszált géntermék kijut-e a sejtekből vagy sem.

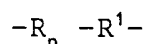
Inzulin analógok kémiai szintézissel is előállíthatók a Märki és munkatársai (Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 360 (1979), 1619-1632) által leírt módszerrel analóg eljárásokkal. A megfelelő aminosav szubsztitúciókat és deléciókat tartalmazó A- és B-láncok külön is szintetizálhatók, ami után a módosított A- és B-láncok diszulfid hidak létrejöttével kapcsolhatók össze az ismert módszer alapján, melyet Chance és munkatársai tettek közzé (Rick DH, Gross E (eds) Peptides: Synthesis - Structure - Function. Proceedings of seventh American peptide



symposium, Illionis, pp. 721-728).

Az inzulin analógok előállíthatók továbbá a 01635229A lajstromszámú Európai Szabadalmi leírásban közzétett módszer szerint. Ilyen módszerrel a B28 vagy B29 helyzetben bázikus aminosavat (amennyiben a végtermékben is bázikus aminosav van ezen a helyen) tartalmazó humán inzulin analóg prekuzora a Gly^{A1}-hez kapcsolt és az élesztő expresszálja és választja ki. Ezt peptid kötést vagy a különböző hosszúságú peptidláncot a megfelelő helyzetű diszulfid hidakkal, azután Morihara módszerrel vagy az úgynevezett transzpeptidálási reakcióval (lásd a 4, 343, 898. lajstromszámú Amerikai szabadalmat) átalakítják a kívánt emberi inzulin analóggá.

A találmány tárgyát képező inzulin analógok előállíthatók oly módon, hogy a kérdéses inzulin analóg prekuzort kódoló DNS szekvenciát klónozzák egy megfelelő élesztő expressziós vektorba, amely miután betranszformálták az élesztőbe, megfelelő táptalajban tenyésztve a transzformánsokat, képes expresszálni és kiválasztani az inzulin analóg prekuzorát, amelyben [Lys^{B28}], [Arg^{B28}], [Lys^{B29}] vagy [Arg^{B29}] van a Gly^{A1}-hez kapcsolva egy peptid kötéssel vagy a III-as képlettel jellemzett peptidlánccal,



(III)

ahol az R egy n számú aminosav származékot tartalmazó peptid-lánc, amikor az n egy 0-tól 33-ig terjedő egész szám, az R¹ pedig Lys vagy Arg. A prekuztot ezután kinyerik a fermentációs táptalajból és a IV-es képlettel jellemzett



amino vegyülettel reagáltatják, ahol a Q egy aminosav származék, leginkább Thr, vagy egy dipeptid, az R'' pedig védő, karboxi csoport (általában metil vagy tercier-butil származék). A reakciót a 4, 343, 898 lajstromszámú Amerikai szabadalomban leírt módszerrel analóg módon végzik szerves oldószer és víz keverékében tripszint vagy tripszin szerű enzimet használva katalizátorként, miáltal a védő karboxi csoportot eltávolítják és az inzulin analógot a reakció elegyből izolálják.

Amennyiben az inzulin analógok Lys-től vagy Arg-től különböző aminosav származékot tartalmaznak a B-lánc C-terminális végén, szintén előállíthatók az EP195 691 lajstromszámon közzétett Európai Szabadalomban leírt módszerrel analóg eljárással. Ennél a módszernél, az A- és B-láncok között egy pár bázikus aminosavból (Lys, Arg) álló hidat tartalmazó inzulin analóg prekuzzorokat élesztőben állítják elő és azután enzimes konverzióval alakítják át inzulin analóggá.

Ha a B-láncban a C-terminális aminosav származék Lys vagy

Arg akkor az inzulin analógok előállíthatók a fenti bioszintetikus prekursorból, tripszinnel végzett enzimatis hasítással.

A találmány tárgyát képező emberi inzulin analógok, amelyekben a csak a B-lánc C-terminális végéhez legközelebb eső utolsó néhány aminosav származék tartalmaz szubsztitúciókat per se is előállíthatók mégpedig sertés inzulinból, mivel a sertés inzulin, amint azt Inoye, K. és munkatársai JACS 101. (3), 1978, 751-752 közleményükben leírják, tripszinnel hasítható des-(B23-30)- emberi inzulinra, amely azután szintén enzimatisan, párosítható a kívánt aminosav szekvenciájú szintetikus peptiddel.

Az inzulin analógok felhasználhatók új inzulin készítmények előállítására, amelyekben az inzulin aktivitást a szakterületen ismert inzulin készítési módokon emberi vagy sertés inzulinnal helyettesítik. Az ilyen, új inzulin készítmények a találmány tárgyát képező inzulin analógokat vagy a gyógyszer-gyártásban elfogadott sókat tartalmaznak vizes oldatban vagy szuszpenzióban, leginkább semleges pH értéken. A vizes közeget izotóniásra készítik nátrium klorid, nátrium acetát vagy glicerin hozzáadásával. A vizes közeg tartalmazhat továbbá cink ionokat, puffereket pl. acetát és citrát, valamint tartósító-



szereket mint az m-krezol, metil-paraben vagy fenol. Az inzulín készítmény pH-ját a kívánt értékre állítják és szűréssel sterilizik.

Az inzulín analógokat keverhetik egyéb megvédett inzulín aktivitással rendelkező analógokkal is annak érdekében, hogy gyorsan ható és megvédett inzulint tartalmazó készítményeket kapjanak.

A találmány inzulín készítményei a már ismert inzulín készítmények alkalmazásához hasonló módon használhatók fel.

SZAKKIFEJEZÉSEK

Az aminosavak esetében használt rövidítések a J. Biol. Chem. 243 (1968), 3558 számában megállapítottak. Az aminosavak L-konfigurációban vannak. Ha külön nem jelezzük, akkor minden esetben az emberi inzulínról van szó.

A RAJZOK RÖVID LEÍRÁSA

A találmány leírásában illusztrációként mellékelünk ábrákat, amelyekben bemutatjuk

1. ábrán a pYGABA 14276 expressziós plazmidot,
2. ábrán a pAB24 élesztő vektort
3. ábrán a pKFN-864 plazmidból származó 0.4kb méretű

EcoRI-XbaI fragmentum DNS szekvenciáját és

4. ábrán a pKFN-866 expressziós plazmid készítését.

RÉSZLETES LEÍRÁS

A módosított inzulin prekuzort kódoló DNS szekvenciát egy expressziós "kazettában" készítettük, amely az 1. ábrán bemutatott pYGABA expressziós plazmid BamHI helyén található, 1103 bázispár hosszú és tartalmazza a következőket (az 5'-végről kiinduló sorrendben): A GAPDH promoter (Travis és munkatársai, J. Biol. Chem., 260. (1985), 4384-4389), utána a kódoló régió, amely tartalmazza: a Kurján és Herskovitz által leírt vad típusú élesztő DNS szekvenciája által kódolt MF α 1-vezér szekvencia N-terminálisának 83 aminosavát, majd a Lys-t és Arg-t kódoló AAA és AGA tripletteket és az egy szálú des-[Thr^{B30}]-emberi inzulin (SCI) prekuzort kódoló régiót, amely az élesztő által preferált kodonokat fölhasználó szintetikusan előállított gén. Két stop kodon után egy SalI restrikciós hely található és a maradék szekvencia a terminátor régiót tartalmazó MF α 1-szekvencia. A szekvenciát az általánosan használt technikák alkalmazásával készítettük.

Az alkalmazott módszer az "oligonukleotid helyspecifikus

mutagenézis" volt, amelyet Zoller és Smith írtak le a DNA, Vol. 3, No. 6 (1984), 479-488 számában. A következőkben röviden leírjuk a módszert, az 1. Példában azonban hosszab leírása is megtalálható. Az inzulin prekursor szekvenciát az expressziós plazmidből izoláljuk és egy egyszálú genomba építjük be, a kör alakú M13 bakteriofág vektorba. Ezután a kémiai szintetizált komplementer DNS szálát csatoljuk az egyszálú genomhoz. A DNS szál tartalmazza a kívánt szekvenciát, környezetében pedig az inzulin szekvenciával teljesen homológ részek találhatóak a kör alakú DNS-en. Ezt követően *in vitro*, Klenow polimerázt használva biokémiaiilag teljesen kiterjesztjük a primert a kör alakú genom teljes hosszában. Ez a szál egyszálú fágokat eredményez, amelyek *E. coli*-ban növesztve lehetőséget adnak dupla szálú DNS izolálására. Ebből a dupla szálú DNS-ből azután lehet restrikciós fragmentumot izolálni és egy expressziós vektorba újra beépíteni.

A TALÁLÁMÁNY MEGVALÓSÍTÁSI MÓDJAI

A találámányt az alábbi példákon keresztül mutatjuk be.

I. Példa

A des[Phe⁸²⁵]-SCI inzulin analóg expresszálására használható expressziós plazmid készítése.

A pYGABA (1. ábrán bemutatott) expressziós plazmidban lévő expressziós kazettát egy BamHI restrikciós fragmentumon izoláltuk. Az expressziós vektort BamHI restrikciós endonukleázzal inkubáltuk az alábbi körülmények között: 20 μ g plazmid DNS, 50 egység BamHI, 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH=7.5, 10 mM MgCl₂, és 1 mM DTT 100 μ l össz-térfogatban. A hőmérséklet 37 °C, a reakció idő 2 óra volt. A két fragmentumot 1%-os agaróz gélen választottuk el, majd a kívánt DNS darabot visszaizoláltuk.

Ligálás az M13mp18 vektorba

Az izolált restrikciós fragmentumot, az előzőleg szintén BamHI restrikciós endonukleázzal emésztett M13mp18 fágvektorba ligáltuk a következő reakció elegyben: 0.2 μ g fragmentum, 0.02 μ g vektor, 50 mM Tris-HCl, pH=7.4, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT és 1 mM ATP 20 μ l össz-térfogatban. Ebből az elegyből 5 μ l-t

transz-formáltunk az E. coli JM101 törzsbe. A fragmentum meglétét és orientációját a vektorban a transzformánsokból izolált dupla szálú M13 DNS restrikciós térképezésével ellenőriztük.

Egyszálú DNS (ss-DNS) izolálása (templát)

A fenti transzformánsokból Messing által a Gene-ben (19. (1982) 269-276) leírt módszer alapján izoláltunk egyszálú DNS-t.

A mutagenizációs primer 5' foszforilálása

Az 5'-TTGGAGTGTAGAAACCTCTT-3' szekvenciájú mutagenizációs primer 5' végét 30 μ l reakció elegyben végeztük, amely a következő komponenseket tartalmazta: 70 mM Tris-HCl, pH=7.0, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 mM ATP, 100 pmol oligonukleotid és 3.6 egység T4 polinukleotid kináz. A reakció idő 30 perc, a hőmérséklet 37 °C volt. Ezután inaktiváltuk az enzimet 65 °C-on, 10 percig tartó inkubálással.

A templát és a foszforilált mutagenizációs primer csatolása

A templát és a primer csatolását 10 μ l térfogatban hajtottuk végre. A reakcióelegy tartalmazott 0.5 pmol templátot, 5 pmol primert, 20 mM Tris-HCl-t, pH=7.5, 10 mM MgCl₂-ot, 50 mM NaCl-ot és 1 mM DTT-t. 65 °C-on melegítettük 10 percig, majd



lehűtöttük 0 °C-ra.

Extenzió és ligálás

A fenti reakcióelegyhez 10 µl-t adtunk a következő keverékből: 0.3 mM dATP, 0.3 mM dCTP, 0.3 mM dGTP, 0.3 mM dTTP, 1 mM ATP, 20 mM Tris-HCl, pH=7.5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 3 egység T4 ligáz és 2.5 egység Klenow polimeráz. A reakciót ezután 16 °C-on végeztük 16 órán keresztül.

A JM101 transzformálása

A fenti reakció elegyet különböző hígításokban transzformáltuk CaCl₂-dal kezelt *E. coli* JM101 törzsbe az általános módszerrel és 2 X YT lemezek felületére kentük ki 2 X YT topagarban. (2 X YT=16 g/l tripton, 10 g/l élesztő kivonat, 5 g/l NaCl; 2 X YT topagar= 2 X YT kiegészítve 0.4% agarózzal és autoklávozva; 2 X YT agar lemez= 2 X YT kiegészítve 2% agarral és autoklávozva) Ezután a lemezeket 37 °C-on inkubáltuk egy éjszakán át.

A pozitív klónok azonosítása

A plakk hibridizációt használtuk, amelyet az alábbiakban ismertetünk: Nitrocellulóz filtert helyeztünk a lemezek felületére, úgy, hogy a plakkok jól látszódnak, tehát a filtert előzőleg megnedvesítettük. Ezután a filtert a következő oldatokba tettük: 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH 30 másodpercre, 1.5 M NaCl,

0.5 M Tris-HCl, pH=8.0 1 percre, 2X SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M nátrium-citrát) a felhasználásig. A filtert 3MM szűrőpapíron szárítottuk és 80 °C-on, 2 óráig sütöttük vákum sütőben.

Az 5'-TTGGAGTGTAGAAACCTCTT-3' szekvenciájú mutagenizációs primer radioaktívan jelöltök az 5'-végén 30 μ l reakcióelegyben, amely tartalmazott 70 mM Tris-HCl-t pH=7.5, 10 mM MgCl₂-ot, 5 mM DTT-t, 10 pmol oligonukleotidot, 20 pmol γ -³²P-ATP-t és 3.5 egység T4 polinukleotidkinázt. Az elegyet 37 °C-on inkubáltuk 30 percig, majd 100 °C-ra tettük 5 percre.

A száraz filtert 2 órán keresztül 65°C-on előhibridizáltuk 6 X SSC, 0.2% bovin-szérum albumin (BSA), 0.2% Ficoll, 0.2% polivinil-pirrolidin, 0.2% nátrium-lauril-szulfát (SDS) és 50 μ g/ml hering sperma DNS tartalmú hibridizációs pufferben. Ezután a jelölt próbát tartalmazó reakcióelegyet hozzáadtuk 15 ml friss hibridizációs pufferhez és ebben inkubáltuk a filtert 28 °C-on egy éjszakán keresztül rázatva. A hibridizáció után a filtert 3 X 15 percig mostuk 2 X SSC-t + 0.1% SDS-t tartalmazó oldatban, majd autoradiografáltuk. A mosás után ugyanabban az oldatban, de most 52 °C-on és másik autoradiográfiával a mutagenizációs primerrel komplementer DNS szekvenciákat tartalmazó plakkokat azonosítottuk.

A pozitív klónok ismételt vizsgálata

Mivel az azonosított klón heteroduplex eredménye, a plakot újra kiszélesztettük lemezre, majd megismételtük a hibridizációt és az azonosítást.

Duplaszálú M13-fág DNS tisztítása

Az újra ellenőrzött klónt használtuk az E. coli JM101 törzs fertőzésére. Egy megközelítőleg 10^8 fágot és 5 JM101 telepet tartalmazó tenyészet 5 ml-ét növesztettük 5 órán keresztül $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on 2 x YT táptalajban. Ezután duplaszálú, cirkuláris DNS-t tisztítottunk a csapadékból a Birnboim és Doly által a Nucleic Acids Res.-ben (2 (1979), 1513.) leírt módszer szerint.

A módosított inzulin prekuzort tartalmazó restrikiós fragmentum izolálása

A fenti módon izolált izolált (körülbelül $5\text{ }\mu\text{g}$) DNS készítményt 10 egység BamHI restrikiós endonukleázzal emésztettük $60\text{ }\mu\text{l}$, 100 mM NaCl , 50 mM Tris-HCl , $\text{pH}=7.5$, 10 mM MgCl_2 és 1 mM DTT tartalmú oldatban 2 órán keresztül $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on. A DNS termékeket agaróz gélen különítettük el majd a fragmentumot gélből tisztítottuk.

Ligálás a pAB24 élesztő vektorba (2. ábra)

Az izolált restrikiós fragmentumot az előzőleg BamHI



restrikciós endonukleázzal emésztett pAB24 élesztő vektorba ligáltuk a következő reakcióelegyben: 0.2 μg fragmentum, 0.02 μg vektor, 50 mM Tris-HCl, pH=7.4, 10 mM MgCl_2 , 10 mM DTT és 1 mM ATP 20 μl össz-térfogatban. Ennek a reakcióelegynek az 5 μl -ét használtuk az MC1061 E. coli törzs transzformálására, amelyben a módosított expressziós plazmidot azonosítottuk és szaporítottuk. A kiejtett kodon kivételével a plazmid megegyezett pYGABA plazmiddal.

Az élesztő transzformálása

Az expressziós plazmid transzformálását a Saccharomyces cerevisiae JC482 $\Delta\text{pep}\Delta\text{Leu}2\text{cir}$ (α , his4, pep4, ura3, leu2, cir) törzsébe az Ito és munkatársai által a J. Bacteriol.-ban (153, No.1 (1983), 163-168) leírt módszer szerint végeztük. A transzformált sejteket SC-ura táptalajra (0.7% Yeast Nitrogen Base, 2.0% glükóz, 0.5% casamino sav, 2.0% agar) kentük ki a plazmidot tartalmazó sejtek szelektálására.

II. példa

A des[Tyr^{B26}]-SCI termelésére használható expressziós plazmid készítése.

Az alkalmazott eljárás megegyezik az I.példában leírtakkal, azzal a különbséggel hogy, a mutagenizációs primer szek-

venciája: 5'-ACCCTTTGGAGTGAAGAAACCTCT-3', a hibridizáció hőmérséklete 36 °C és a hibridizáció utáni mosás 60 °C-on történt. A kiejtett kodon kivételével a módosított plazmid szekvenciája azonos a pYGABA plazmidével.

III. példa

A [His^{B25}],des[Tyr^{B26}]-SCI termelésére használható expressziós plazmid készítése.

Az alkalmazott eljárás megegyezik az I. példában leírtakkal azzal a különbséggel hogy, a mutagenizációs primer szekvenciája: 5'-AATACCCTTTGGAGTGTTGAAACCTCTTTCACC-3', a hibridizáció hőmérséklete 42 °C volt és a hibridizáció utáni mosás 65 °C-on történt. A módosított és kiejtett kodonok kivételével a módosított plazmid szekvenciája megegyezik a pYGABA plazmidével.

IV. példa

A [Asn^{B25}],des[Tyr^{B26}]-SCI termelésére használható expressziós plazmid készítése.

Az alkalmazott eljárás megegyezik az I. példában leírtakkal azzal a különbséggel hogy, a mutagenizációs plazmid szekvenciája: 5'-AATACCCTTTGGAGTGTTGAAACCTCTTTCACC-3', a hibridizáció hőmérséklete 42 °C volt és a hibridizálás után a mosás 65 °C-on történt. A módosított és kiejtett kodonok kivételével a



módosított plazmid szekvenciája megegyezik a pYGABA plazmidéval.

V. példa

A prekursor expressziója és izolálás a táptalajból.

Az I.-IV. példákban leírt módon transzformált élesztő sejteket Petri-csészében, minimál táptalajon, uracil nélkül növesztettük 48 órán keresztül, 30 °C-on. A Petri-csészéből származó egy teleppel inokuláltunk 100 ml-es palckokat, amelyekben uracil nélküli, 5 g/l casamidosavat + 10 g/l szukcinilt + 30 g/l glükózt tartalmazó, pH=5.0 minimál táptalaj volt. A palackokat 30 °C-on rázattuk 72 órán keresztül.

Centrifugálás után az összegyűjtött 1 liter felülúszót szűrővel sterileztünk és 5 M HCl és víz hozzáadásával beállítottuk a pH=4 - 4.5, valamint vezetőképesség 10 mS-nél kisebb értékét. Ezt a felülúszót azután egy előzőleg 50 mM ecetsav, 50% (tf) pH=4.0 (NaOH-val beállítva) eleggyel telített, 1.6 x 6 cm S/Sepharose FF töltetű oszlopra vittük 120 ml/óra áramlási sebességgel. Az oszlopot 60 ml pufferrel mostuk, majd a prekuzort eluáltuk 360 ml NaCl puffer 0 - 0.35 M lineáris gradiensevel, 10 ml/óra térfogatárammal. Az eluátumot 4 ml-es frakciókra osztottuk és UV abszorbanciát mértünk. A prekuzort tartalmazó frakciókat RP-HPLC analízissel azonosítottuk és

összegyűjtöttük. Sephadex G25 oszlopon, 1 M ecetsavval végzett sótelenítés után liofilezéssel izoláltuk a prekuzort.

VI. példa

A des[Phe^{B25}],des[Thr^{B30}]-emberi inzulin előállítás

Az I. és V. példákban leírt módokon készített 400 mg des[Phe^{B25}]-t felodottunk 40 ml 50 mM tris-hidroximetil-aminometán és 20% (tf) etanol, pH=9.0 (HCl) tartalmú oldatban és hozzáadtunk 40 ml, 32 mg immobilizált tripszint tartalmazó Sepharose ugyanabban a pufferben készült keverékét. A szuszpenziót 8 -10 °C-on hagytuk 24 óráig, gyengén rázatva, majd leszűrtük. A gélt 40 ml pufferrrel mostuk és az összegyűjtött szűrleteket előzőleg 50 mM tris-hidroximetil-aminometán, 50% (tf) etanol, pH=8.0 (HCl) tartalmú oldattal telített, 2.6 x 7.5 cm méretű Q-Sepharose FF oszlopra vittük. Ezután eluáltuk az oszlopot NaCl puffer 0 - 0.15 M gradiensével, 6 órán keresztül 225 ml/óra térfogatárammal. A frakciókat UV abszorban-
ciával vizsgáltuk és a fő proteint tartalmazó csúcsot összegyűjtöttük. Az alkohol vákuumos eltávolítása után a fehérjét pH=5.4-en kicsaptuk. 250 mg des[Phe^{B25}],des[Thr^{B30}]-emberi inzulin izoláltunk liofilezéssel.

A termék azonosságát megerősítettük aminosav analízissel, PD-tömegspektrometriával és az elválasztott, vinilpiridilált A-



és B-láncok Edman degradálásával.

VII. példa

A des[Phe^{B25}]-emberi inzulin előállítására.

A VI. példában leírt módszerekkel készített 200 mg des[Phe^{B25}], des[Thr^{B30}]-emberi inzulint feloldottunk 400 mg treonin metil észter, 2.0 ml etanol és 0.8 ml víz keverékében. A pH-t ecetsavval beállítottuk 6.3-ra és 4 ml 3.2 mg immobilizált tripszint tartalmazó Sepharose keveréket adtunk hozzá. 2 óra 20 °C-on végzett gyenge rázatás után a gélt szűrővel eltávolítottuk és a fehérjét 10 térfogat 2-propanol hozzáadásával kicsaptuk. A légszáraz csapadékot újraoldottuk 20 mM tris-hidroximetil-aminometán/HCl, 60% (tf) etanol, pH=8.25 oldatban és 2.6 x 20 cm méretű Q-Sepharose FF oszlopra vittük, amelyet előzőleg a fenti pufferrel telítettünk, majd NaCl ugyanezen pufferben készült lineáris gradiensével eluáltuk 15 órán keresztül, 125 ml/óra térfogatárammal. A des-[Phe^{B25}]-humán inzulin-B30-metil észterét tartalmazó összegyűjtött frakciókról vákumban eltávolítottuk az alkoholt és a fehérjét pH=6.1 mellett kicsaptuk. A szuszpenziót lecentrifugáltuk és a csapadékot liofileztük. A metil észtert ezután 10 mg/ml fehérje koncentrációnál 10 percig hidrolizáltuk 0.1 M hideg NaOH oldatban. A reakciót pH=8.5 beállításával és 2 tér-

fogat 20 mM tris-hidroximetil-aminometán/HCl pH=8.5 hozzáadásával állítottuk le. Az oldatot ezután 2.6 x 20 cm méretű Q-Sepharose FF töltetű oszlopra vittük és a fentebb leírt módon eluáltuk. Az etanol vákumos eltávolítása után a fehérjét pH=5.5 beállításával kicsaptuk.

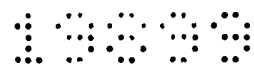
80 mg des[Phe^{B25}] humán inzulint kaptunk liofilezés után.

A termék azonosságát aminosav analízissel, PD-tömegspektrometriával és a szétválasztott, vinilpiridilált A- és B-láncok Edman degradálásával erősítettük meg.

VIII. példa

A des[Tyr^{B26}],des[Thr^{B30}]-humán inzulin előállítása

A II és V. példákban leírt módokon készült 250 mg des-[Tyr^{B26}]-SCI-t felodottunk 25 ml 50 mM tris-hidroximetil-aminometán, 20% (tf) etanol, pH=9.0 /HCl oldatban és hozzáadtunk 25 ml, 20 mg immobilizált tripszint tartalmazó Sepharose ugyanezen pufferben készült szuszpenzióját. A szuszpenziót 24 órán keresztül gyengén rázattuk 8 - 10 °C-on és utána leszűrtük. A gélt 25 ml pufferrel mostuk és az összegyűjtött szűrletet 2.6 x 7.5 cm méretű Q-Sepharose töltetű oszlopra vittük, amelyet előzőleg telítettünk, 50 mM tris-hidroximetil-aminometán és 50% (tf) etanol pH=8.0 (HCl) tartalmú oldattal. Ezután eluáltuk az oszlopot NaCl ugyanezen pufferben készült 0 - 0.15 M



lineáris gradiensével 6 órán keresztül 225 ml/óra térfogatárammal. Az eluátumot UV-abszorbanciával vizsgáltuk és a fő protein csúcsot tartalmazó frakciókat összegyűjtöttük. Az alkohol vákumos eltávolítása után a fehérjét pH=5.4 beállításával kicsaptuk.

130 mg des[Tyr^{B26}],des[Thr^{B30}]-humán inzulint izoláltunk liofilezés után.

A termék azonosságát aminosav analízissel és a szétválasztott, vinil-piridilált A- és B-láncok Edman degradálásával erősítettük meg.

IX. példa

A des[His^{B25}],des[Tyr^{B26}],des[Thr^{B30}]-humán inzulin előállítás.

A III. és V. példákban leírt módszerekkel készített [His^{B25}],des[Tyr^{B26}]-SCI 450 mg-ját feloldottuk 45 ml 50 mM tris-hidroximetil-aminometán és 20% (tf) etanol, pH=9 (HCl) oldatában majd hozzáadtunk ugyanezen pufferben készült, 36 mg immobilizált tripszint tartalmazó Sepharose-t. A szuszpenziót lassan rázatva állni hagytuk 24 órán keresztül 8 -10 °C-on, majd leszűrtük. A gélt 40 ml pufferrel mostuk és az összegyűjtött szűrletet 2.6 x 7.5 cm méretű Q-Sepharose FF oszlopra vittük, amelyet előzőleg 50 mM tris-(hidroximetil)-aminometán és 50%

etanol tartalmú, pH=8.0 (HCl) pufferrel telítettünk. Ezután eluáltuk az oszlopot NaCl ugyanezen pufferben készült lineáris gradiens oldatával (0 - 0.15 M) 6 órán keresztül, 225 ml/óra térfogatárammal. Az eluátumot UV-abszorbanciával vizsgáltuk és a fő protein csúcsot tartalmazó frakciókat összegyűjtöttük. Az alkohol vákuumos eltávolítása után a pH=5.4 beállításával kicsaptuk a fehérjét.

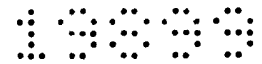
200 mg [His^{B25}],des[Tyr^{B26}],des[Thr^{B30}]-humán inzulint izoláltunk liofilezéssel.

A termék azonosságát aminosav analízissel és a szétválasztott, vinil-piridilált A- és B-láncok Edman degradálásával erősítettük meg.

X. példa

Az [Asn^{B25}],des[Tyr^{B26}],des[Thr^{B30}]-emberi inzulin előállítására

A IV. és V. példákban leírt módszerek szerint készített [Asn^{B25}],des[Tyr^{B26}]-SCI-ből 150 mg-ot feloldottunk 15 ml 50 mM tris-(hidroximetil)-aminometán, 20% (tf) etanol, pH=9 (HCl) oldatában és hozzáadtunk 12 mg immobilizált tripszint tartalmazó Sepharose, ugyanezen pufferben készült szuszpenziójából 15 ml-t. A szuszpenziót 24 órán át gyengén rázattuk 8 - 10 °C-on, majd leszűrtük. A gélt 40 ml pufferrel mostuk, majd az



összegyűjtött szűrleteket 1.6 x 10 cm méretű Q-Sepharose FF-ből készült oszlopre vittük, amelyet előzőleg 50 mM tris-(hidroximetil)-aminometán, 50% (tf) etanol, pH=8.0 (HCl) oldattal telítettünk. Az oszlopot ezután NaCl ugyanezen pufferben készített lineáris grádiens oldatával (0 - 0.15 M) eluáltuk 6 órára keresztül 90 ml/óra térfogatárammal. Az eluátumot UV-abszorbanciával vizsgáltuk és a fő protein csúcsot tartalmazó frakciókat összegyűjtöttük. Az alkohol vákuumos eltávolítása után a pH=5.4 beállításával kicsaptuk a fehérjét.

80 mg [Ans^{B25}], des[Tyr^{B26}], des[Thr^{B30}]-humán inzulint izoláltunk liofilezés után.

A termék azonosságát aminosav analízissel és a szétválasztott, vinil-piridilált A- és B-láncok Edman degradálásával erősítettük meg.

XI. példa

Az [Asp^{A21}], des[Tyr^{B26}], des[Thr^{B30}]-humán inzulin előállítására

A VI. példában leírt módszerek szerint készített des-[Phe^{B25}], des[Thr^{B30}]-humán inzulinból 50 mg-ot feloldottunk 10 ml, 1 M HCl-lel 2-re állított pH-jú vízben. Az oldatot 30 °C-on hagytuk 16 órára keresztül. Lehűlés (20 °C-ra) után 7.5 g karbamidot adtunk hozzá és a pH=8.1 értéket állítottuk be 1 M NaOH-dal. Az oldatot ezután egy 1.6 x 20 cm méretű Q-Sepharose FF

oszlopra vittük, amelyet előzőleg 20 mM tris-(hidroximetil)-aminometán/HCl, 7 M karbamid, pH=8.1 oldattal telítettünk 4 °C-on, majd NaCl, ugyanezen pufferben készült lineáris grádiens oldatával (0 - 0.05 M) eluáltuk 24 órán keresztül 40 ml/óra térfogatárammal. Az utolsó eluálódó csúcsból összegyűjtöttük a proteint tartalmazó frakciókat és Sephadex G25 oszlopon 1 M ecetsavval sótalanítottuk, majd liofileztük.

30 mg [Asp^{A21}],des[Phe^{B25}],des[Thr^{B30}]-humán inzulinhoz jutottunk.

A termék azonosságát aminosav analízissel, 5 lépéses Edman degradálással és karboxipeptidáz-A-val végzett C-terminális analízissel erősítettük meg.

XII. példa

A [Ser^{A21}],des[Pro^{B28}]-humán inzulin előállítására

A [Ser^{A21}],des[Pro^{B28}]-humán inzulin előállítására használható expressziós plazmid készítése és a [Ser^{A21}],des[Pro^{B28}]-humán inzulin készítése.

Az analógot kódoló, pUC19 eredetű, pKFN - 864 plazmidot a pKFN -734 plazmidból, a Morinaga és munkatársai által leírt (Biotechnology 2 (1984), 636-639), "gapped duplex mutagenesis"-nek nevezett módszerrel készítettük két mutagén primer, a NOR-648 CTAGAGCCTGCGGGCTGCGTCTAGCTGCAGTAG és a NOR-745 ATTGTT-



CGACAATACCCTTAGCAGCCTTGGTGTAGAAGAAACCTCTTTCACC felhasználásával. A pKFN-734 plazmidot úgy készítettük, hogy a pUC-19 2.7 kb méretű EcoRI-XbaI fragmentumába ligáltunk egy 0.4 kb nagyságú EcoRI-XbaI fragmentumot, amely a pLaC212spX3 plazmidból származó szintetikus inzulin prekursor [B(1-29)-AlaAlaLys-A(1-21)] génhez "frame-ben" kapcsolt élesztő vezető szignált kódolt.

A pLaC212spX3 plazmid megtalálható a III. példa leírásában és a 6. ábrán, valamint a nemzetközi szabadalmi leírásban a WO 89/02463 lajstromszám alatt.

A szignál-vezér-inzulin B(1-29),des28Pro)-ALaAlaLys-A(1-21,21Ser), pKFN-864 plazmidból származó 0.4 kb méretű EcoRI-XbaI fragmentum DNS szekvenciáját a 3. ábrán adjuk meg.

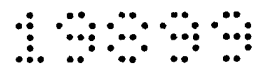
Az EcoRI és XbaI enzimekkel hasított pKFN-864 plazmid 0.5 kb nagyságú fragmentumát összeligáltuk a pMT636 plazmidból származó 9.5kb NcoI-XbaI és 1.4kb NcoI-EcoRI fragmentumokkal, miáltal a pKFN-866 plazmidhoz jutottunk (lásd 4. ábra). A pMT636 plazmidot a pMT608-ból (a LEU-2 gén eltávolítása után) és a pMT479-ből készítettük (lásd 4. ábra). A pMT608 az EP 195 691, a pMT479 az EP163 529 lajstromszámú szabadalmi leírásban található. A pMT479 tartalmazza a Schizosaccharomyces pombe TPI (POT) génjét, a S. cerevisiae triózfoszfát izomeráz promo-

terét és terminátorát, (TPI_p és TPI_r) (Alber, T. és Kawasaki, G. J. Mol. Appl. Gen. 1 (1982), 419-434) A pKFN-866 plazmid a következő szekvenciát tartalmazza:

TPI_p-vezér-szignál-inzulin B(1-29, des28 Pro)-AlaAlaLys-A(1-21, 21 Ser)-TPI_r

Az MT663 (E2-7B XE11-36 a/α, ΔtpiΔtpi, pep4-3/pep4-3) S. cerevisiae törzset YPGaL táptalajban (1% Bacto élesztő kivonat, 2% Bacto pepton, 2% galaktóz, 1% laktát) növesztettük OD₆₀₀ = 0.6 értékig.

A kapott tenyészet 100 ml-ét lecentrifugáltuk, 10 ml vízzel mostuk és újra szuszpendáltuk 10 ml 1.2 M szorbitolt, 25 mM Na₂EDTA-t, pH=8.0 és 6.7 mg/ml ditiotreitolt tartalmazó oldatban. A szuszpenziót 15 percig inkubáltuk 30 °C-on, lecentrifugáltuk és a sejteket újra szuszpendáltuk 10 ml 1.2 M szorbitolt, 10 mM Na₂EDTA-t, 0.1 M nátrium-citrátot, pH=5.8 és 2 mg Novozym 234-et tartalmazó oldatban. A szuszpenziót 30 percig inkubáltuk, 30 °C-on, a sejteket centrifugálással összegyűjtöttük, mostuk 10 ml 1.2 M-os szorbitollal és 10 ml CAS-sal (1.2 M szorbitol, 10 mM CaCl₂, 10 mM Tris/HCl (Tris= Tris (hidroximetil)aminometán) pH=7.5) és újra szuszpendáltuk 2 ml CAS-ban. Transzformációhoz 0.1 ml CAS-ban szuszpendált sejtet kevertünk össze, kb. 1 μg pKFN-866 plazmid DNS-sel és szobahő-



mérsékleten hagytuk 15 percig. 1 ml, 20% polietilén-glikol 4000, 10 mM CaCl_2 , 10 mM Tris/HCl, pH=7.5 tartalmú oldatot adtunk hozzá, majd a keveréket további 30 percig hagytuk szobahőmérsékleten. Ezután lecentrifugáltuk, majd a csapadékot újra szuszpendáltuk 0.1 ml SOS pufferben (1.2 M szorbitol, 33% (tf) YPD, 6.7 mM CaCl_2 , 14 $\mu\text{g/ml}$ leucin), és 30 °C-on inkubáltuk 2 óráig. A szuszpenziót lecentrifugáltuk és a csapadékot ismét fölszuszpendáltuk 0.5 ml 1.2 M szorbitol oldatban. Ezután hozzáadtunk 6 ml, 52 °C-os top-agart, (1.2 M szorbitolt plusz 2.5% agart tartalmazó SC-táptalaj, Sherman és munkatársai, *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981) és a szuszpenziót szilárd, szorbitol tartalmú agar lemezre öntöttük. 3 nap, 30 °C-os inkubálás után a transzformáns telepeket fölszedtük és folyékony tenyészet indítására használtuk őket. Egy ilyen transzformánst, a KFN-883-at választottuk ki további jellemzésre.

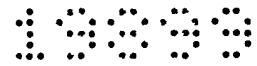
A KFN-883 élesztő törzset YPD táptalajban (1% élesztő kivonat, 2% pepton (a Difco Laboratories-től) és 2% glükóz) növesztettük fel. 10 ml tenyészetet 30 °-on rázattunk $\text{OD}_{600}=20$ denzitás eléréséig. Centrifugálás után a felülúszót HPLC-vel analizáltuk, amint azt Snel, L. és munkatársai leírták a *Chromatographia* 24. (1987), 329-332 számában. A hozam körülbelül 14

mg/liter inzulin B(1-29, des 28 pro)-AlaAlaLys-A(1-21, 21 Ser) volt.

Az egyszálú inzulin prekuzort a fermentáció felülúszójából izoláltuk egy ioncserélő oszlopon, alacsony pH értéken végzett adszorpcióval. A leválasztást magas pH értéken, az összegyűjtött frakciók kicsapását cink ionokkal végeztük. A prekuzor transzpeptidálása [Ser^{A21}], des[Pro^{B28}], [Thr^{B30}-OMe]-emberi inzulinná a következőképpen történt:

10 mmol (2.35 g) treonin metilésztert és jégcetet oldottunk 5 ml DMF-ben, hozzáadtunk 2.5 ml 76.5% (tf) vizes DMF oldatot és a keverékben föloldottunk 0.5 g prekuzort, majd 12 °C-on tartottuk; ezután 50 mg tripszint adunk hozzá 1.25 ml 0.05 M kalcium acetát oldatban és 24 óra, 12 °C-on történt inkubálás után a reakcióelegyet 100 ml acetonba öntöttük a peptidek kicsapása végett, lecentrifugáltuk és vákumban megszáritottuk.

Az izolált inzulin analóg észtert preparatív HPLC oszlopon tisztítottuk szilika-C18 fázison, savas pH mellett. A tisztított észtert vizes közegben hidrolizáltuk, pH=10 mellett, 25 °C-on 24 órán keresztül. A képződött [Ser^{A21}], des-[Pro^{B28}]-humán inzulin-t cink ionokkal csaptuk ki semleges pH értéken. A csapadékot anion cserélő kromatográfiával tisztítottuk és azt követően gélszűrőssel sótanítottuk. 102 mg



volt a liofilizált [Ser^{A21}],des[Pro^{B28}]-humán inzulin kitermelés.

XIII. példa

A des[Thr^{B27}]-humán inzulin készítése

1 g cinkmentes sertés inzulint föloldottunk 40 ml vízben a pH=9 érték beállítása mellett és hozzáadtunk 50 mg sertés tripszint, föloldva 10 ml 0.25 M ammónium-hidrogén karbonát, pH=9 (ammóniával állítva) oldatban. Az oldatot 4 °C-on hagytuk 48 órán keresztül ami a HPLC analízis alapján 65% terméket eredményezett. A reakcióelegyet ezután Sephadex G50 szuperfinom gélből készült oszlopon szűrtük 0.05 M ammónium-hidrogén karbonát oldattal 90 ml/ óra térfogatárammal. A fő protein csúcsot tartalmazó frakciókat összegyűjtöttük és liofileztük. A hozam 520 mg des(B23-B30) humán inzulin volt.

A Gly-Phe-Phe-Tyr-Pro-Lys-Thr szekvenciájú peptidet PAM-gyantán szintetizáltuk az Applied Biosystems peptidszintetizáló készülékével, védett aminosav anhidridekből. A végén a peptidet vízmentes hidrogén-fluoriddal vágtuk le a gyantáról 0 °C-on, miáltal a maradék védőcsoportokat eltávolítottuk.

200 mg des(B23-B30)-humán inzulint és 400 mg peptidet föloldottunk 2.40 ml dimetil-formamid és 1.20 ml víz keverékében, az elegy pH értékét trietil-aminnal állítottuk be 6.5-re. Ezután hozzáadtunk 10 mg sertés tripszin 0.20 ml vizes

oldatát, majd a reakcióelegyet 4 °C-on hagytuk 4 órán keresztül. A reakciót 25 ml 2-propanol hozzáadásával állítottuk le és a kicsapott fehérjét centrifugálással izoláltuk. A felülúszó leszívataása után a csapadékot újra oldottuk 10 ml 1 M-os ecetsavban és föl vittük egy 2.6 x 20 cm méretű, Lichroprep RP-18, előzőleg 0.5 mM sósav, 0.1 M nátrium-klorid 30% (tf) etanolos oldattal telített, töltetből készült oszlopra. Az oszlopot azután 20 °C-on eluáltuk ugyanazzal a pufferrel, de az alkohol koncentrációt lineárisan emeltük 50%-ra, 20 ml/óra térfogatárammal, 24 órán keresztül. Az eluátumot UV-abszorpcióval vizsgáltuk és a fő protein csúcsot tartalmazó frakciókat összegyűjtöttük. A fehérjét ugyanakkora térfogatú víz hozzáadásával és a pH=5.5 nátrium-hidroxiddal történő beállításával csaptuk ki. Állni hagytuk 4 °C-on, 1 órán át, majd a csapadékot centrifugálással és liofilezéssel izoláltuk.

A des[Thr^{B27}]-humán inzulin kitermelése 80 mg volt, az azonosítást a vinil-piridilált A- és B-láncok ismételt degradálásával végeztük.

XIV. példa

Az injektálható oldat készítése

A találmány szerinti emberi inzulin analógból 60 μmol -t föloldottunk 4 ml 0.1 M HCl-ben és hozzáadtunk 20 ml 1.5%-os m-



krezol oldatot. Most az oldatot összekevertük 40 ml 4%-os glicerollal és 20 ml 65 mM-os dinátrium-foszfáttal és a pH értéket 7.3-ra állítottuk be. Végül az oldatot vízzel 100 ml-re töltöttük fel és szűréssel sterilizáltuk.

XV. példa

Az asszociáció fok becslése

Egy 2.6 x 88 cm méretű Sephadex G-75 oszlopot 13 mM-os nátrium-foszfát oldattal, pH=7.3, 22 ml/óra térfogatárammal telítettünk. Des-(oktapeptid-B²³⁻³⁰)-humán inzulint, citokróm C-t, ribonukleázt és a mioglobint monomerjét és dimerjét alkalmazva molekulásúly markerként elúciós térfogattal kifejezett molekulásúly görbét vettünk fel.

1 ml 0.6 mM cinkmentes emberi inzulint vagy 0.6 mM inzulin analógot alkalmazva és a XII.példában leírt módon végrehajtva az eluálást azt találtuk, hogy a cinkmentes emberi inzulin elhúzó csúccal jön le az oszlopról kb. a 14 kD méretű molekulásúly tartományban, a VI.-X.példákban leírt módokon készített analógok pedig szimmetrikus csúcsként eluálódnak az 5 kD körüli molekulásúly tartományban.

Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a találmány tárgyát képező emberi inzulin analógok pH=7.3-as oldatban elsődlegesen monomereknek, míg a normál emberi inzulin ugyanezen körülmé-

nyek között dimerek és nagyobb tagszámú oligomerek keverékének tűnik.

XVI.példa

A biológiai aktivitás becslése

Az in vitro biológiai aktivitás meghatározását az izolált patkány adipociták és hepatociták inzulin receptoraihoz való kötődési képesség mérésével végeztük J. Gliemann és S. Gammeltoft: Diabetológia 10 (1974), 105-113. közleményében leírt módon.

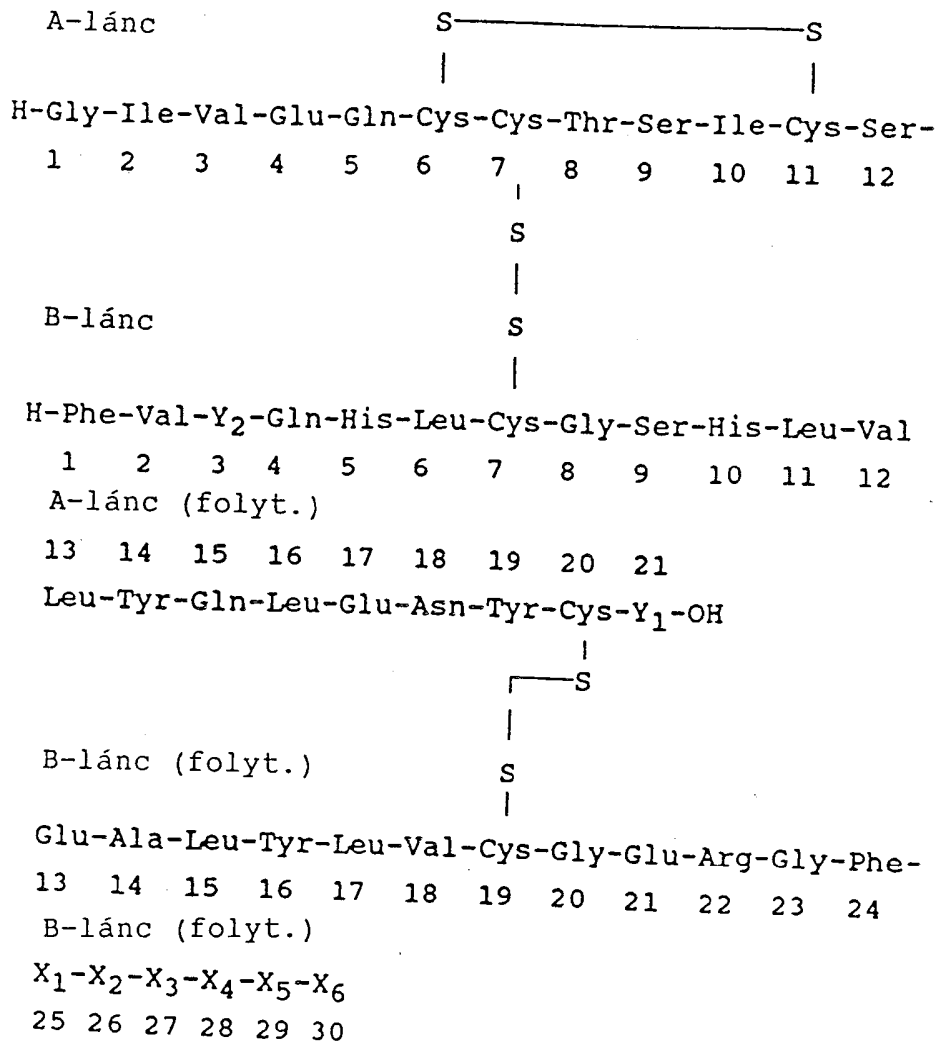
Az inzulin analógokat félszintetikus emberi inzulinhoz hasonlítottuk, amelyeknek a kötődési képességét 100%-nak vettük. Az eredményeket az alábbi táblázatban mutatjuk be.

	Adipociták	Hepatociták
des[Phe ^{B25}],des[Thr ^{B30}]-		
humán inzulin	223%	201%
des[Phe ^{B25}]-humán inzulin	225%	249%
[Asp ^{A21}]-des[Phe ^{B25}],des[Thr ^{B30}]-		
humán inzulin	250%	242%

Szabadalmi igénypontok

1. Emberi inzulin analógok, azzal jellemezve, hogy pozitív töltésű aminosav, úgymint Lys vagy Arg található a B-lánc [Gly^{B20}]-tól számított B28-as és 8-as helyzetében, és ezek további tetszőleges módosítást tartalmaznak a B-lánc C-terminális végén, a [Phe^{B24}]-tól a C-terminális aminosav származékig, azzal a kikötéssel, hogy a B29 helyen nem Pro van és az A21 és/vagy a B3 különbözik az Asn-től.

2. Emberi inzulin analógok, azzal jellemezve, hogy a képletük a következő





ahol az X_1 , X_2 , X_3 , X_5 , Y_1 és Y_2 természetben előforduló aminosav származék; X_4 Lys vagy Arg; és X_6 bármely természetben előforduló aminosav származék, amely C-terminális hidroxil-csoportot vagy -OH-t hordoz vagy az X_5 és X_6 együtt képez egy hidroxil-csoportot.

3. A 2. igénypont szerinti emberi inzulin analógok, azzal jellemezve, hogy az X_5 , a prolin kivételével lehet bármely, a természetben előforduló aminosav.

4. A 2. vagy 3. igénypont szerinti emberi inzulin analógok azzal jellemezve, hogy az Y_1 és /vagy Y_2 , az Asn kivételével lehetnek bármely, a természetben előforduló aminosavak.

5. A 2. igénypont szerinti emberi inzulin analógok, azzal jellemezve, hogy a

X_1 -lehet Phe, Ala, His, Thr, Ser, Asn vagy Tyr

X_2 -lehet Tyr, Thr, Glu, Asp, Ala, His, Ser vagy Phe

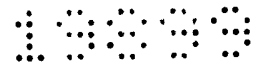
X_3 -lehet Pro, Glu, Asp, Ser, Thr vagy His

X_5 -lehet Lys, Thr, Ser, Ala, Asp vagy Glu

X_6 -lehet Thr-OH, Ser-OH, Ala-OH, Asp-OH, Glu-OH, vagy -OH vagy az X_5 és X_6 együtt képezik a C-terminális hidroxil-csoportot.

Y_1 -lehet Asn, Asp, Gly, Ser, Glu vagy Ala

Y_2 -lehet Asn, Gln, Glu vagy Asp



6. A 2. igénypont szerinti emberi inzulin analógok azzal, jellemezve, hogy

- X₁ -lehet Phe, Ala, His, Thr, Ser, Asn vagy Tyr
- X₂ -lehet Tyr, Thr, Glu, Asp, Ala, His, Ser vagy Phe
- X₃ -lehet Pro, Glu, Asp, Ser, Thr vagy His
- X₅ -lehet Lys, Thr, Ser, Ala, Asp vagy Glu
- X₆ -OH csoport
- Y₁ -lehet Asp, Ala, Gly, Ser, Glu vagy Ala
- Y₂ -lehet Asn, Gln, Glu vagy Asp.

7. A 2. igénypont szerinti emberi inzulin analógok, azzal jellemezve, hogy

- X₁ -lehet Phe, Ala, His, Thr, Ser, Asn vagy Tyr
- X₂ -lehet Tyr, Thr, Glu, Asp, Ala, His, Ser vagy Phe
- X₃ -lehet Pro, Glu, Asp, Ser, Thr vagy His
- X₅ és X₆ együtt képezik egy C-terminális hidroxil-csoportot
- Y₁ -lehet Asn, Asp, Gly, Glu, Ser vagy Ala és
- Y₂ -lehet Asn, Gln, Glu vagy Asp.

8. A 2. igénypont szerinti emberi inzulin analógok, azzal jellemezve, hogy az X₁ Phe; az X₂ Tyr; X₃ Thr, X₅ Lys; az X₆ Thr-OH; az Y₁ lehet Asn, Asp, Ser vagy Gly és az Y₂ lehet Asn, Gln, Asp vagy Glu.

9. A 2. igénypont szerinti emberi inzulin analógok, azzal

jellemezve, hogy az X_1 Tyr; az X_2 Thr; X_3 Pro; az X_5 Thr; az X_6 -OH csoport; Y_1 lehet Asn, Asp, Ser vagy Gly és az Y_2 lehet Asn, Gln, Asp vagy Glu.

10. A 2. igénypont szerinti emberi inzulin analógok, azzal jellemezve, hogy az X_1 Phe; X_2 Thr; X_3 Pro; az X_5 Thr; az X_6 -OH csoport; Y_1 lehet Asn, Asp, Ser vagy Gly és az Y_2 lehet Asn, Gln, Asp vagy Glu.

11. A 2. igénypont szerinti emberi inzulin analógok, azzal jellemezve, hogy az X_1 Phe; X_2 Tyr; X_3 Pro; az X_5 Thr; X_6 -OH csoport; Y_1 lehet Asn, Asp, Ser vagy Gly és Y_2 lehet Asn, Gln, Asp vagy Glu.

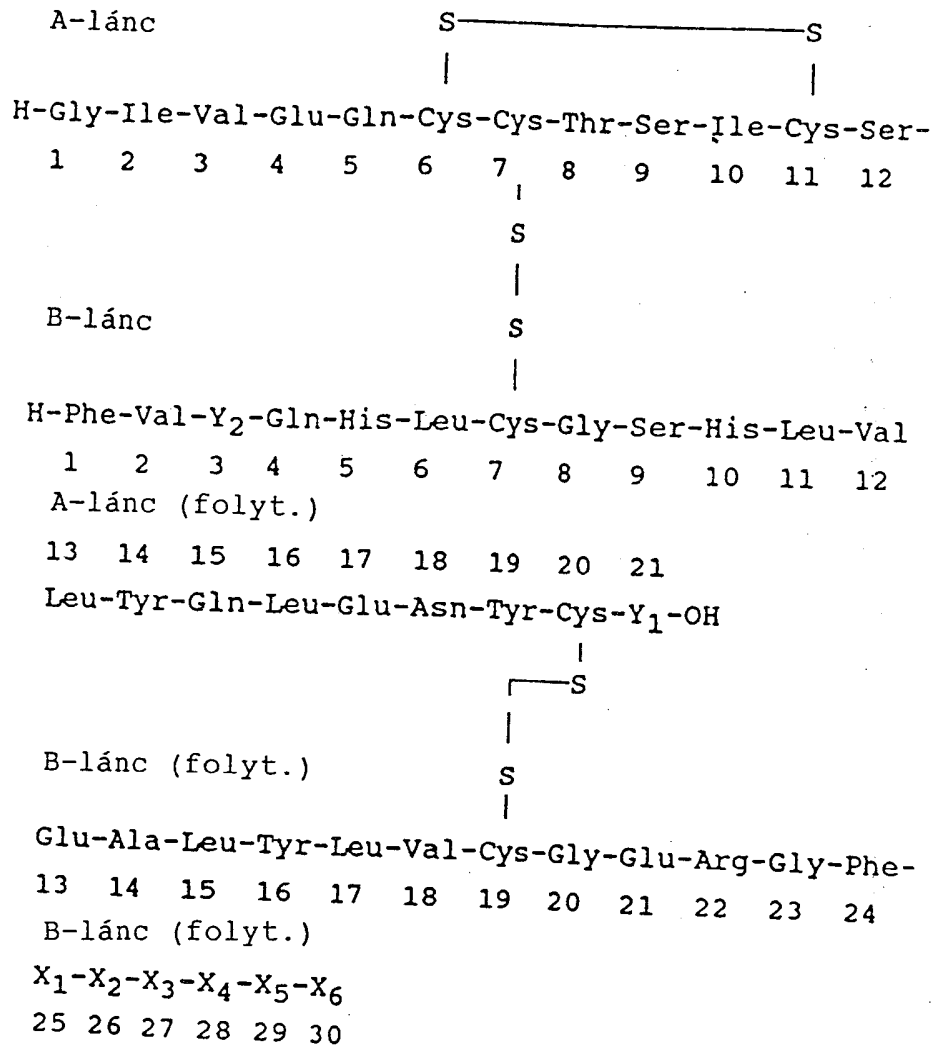
12. A 2. igénypont szerinti emberi inzulin analóg azzal jellemezve, hogy az X_1 aminosav töltés nélküli és gamma-helyzetben tartalmaz egy sp^2 -hibridállapotú szénatomot és X_6 egy -OH csoport.

13. A 12. igénypont szerinti emberi inzulin analógok, azzal jellemezve, hogy az Y_1 és Y_2 az Asn kivételével lehetnek bármilyen természetben előforduló aminosav származékok és X_5 a Thr kivételével lehet bármelyik a természetben előforduló aminosav származék.

14. A 12. igénypont szerinti emberi inzulin analógok, azzal jellemezve, hogy az X_5 és X_6 együtt képezik a -OH csoport-

tot.

15. A következő képlettel jellemzett emberi inzulin analógot tartalmazó gyógyszer összetétel:



ahol az X₁, X₂, X₃, X₅, Y₁ és Y₂ természetben előforduló aminosav származék; X₄ Lys vagy Arg; és X₆ bármely természetben előforduló aminosav származék, amely C-terminális hidroxici csoportot vagy -OH-t hordoz vagy az X₅ és X₆ együtt képezik a hidroxici csoportot vagy a gyógyszeriparilag elfogadható sóik és a gyógyszeriparilag elfogadható hordozók.

16. A 15. igénypont szerinti gyógyszer összetétel, azzal jellemezve, hogy a $\text{pH}=7.3$ értéken alacsony oldhatóságot mutat.

17. A 16. igénypont szerinti gyógyszer összetétel, azzal jellemezve, hogy a nevezett inzulin analóg szükségszerűen monomer.

18. A 15. igénypont szerinti gyógyszer összetétel, azzal jellemezve, hogy vizes oldat formájában készül.

19. A 15. igénypont szerinti gyógyszer összetétel, azzal jellemezve, hogy vizes szuszpenzió formájában készül.

20. A 15. igénypont szerinti gyógyszer összetétel, azzal jellemezve, hogy a gyógyszeriparilag elfogadható hordozó egy izotóniás vizes oldat.

21. A 18., 19. vagy 20. igénypont szerinti gyógyszer összetétel, azzal jellemezve, hogy a vizes oldat, a vizes szuszpenzió vagy az izotóniás vizes oldat tartalmaz még cink ionokat és/vagy puffert (acetát vagy citrát) és/vagy tartósítószeret, mint m-krezol, metil-paraben vagy fenol.

22. A 15. igénypont szerinti gyógyszer összetétel, azzal jellemezve, hogy a több mint egy inzulin analógot tartalmaz.

23. A 15. igénypont szerinti gyógyszer összetétel, azzal jellemezve, hogy szájon át adható vagy bőr alá történő injek-



cióra alkalmas formában készítik.

24. A 15. igénypont szerinti gyógyszer összetétel, azzal jellemezve, hogy parenterális alkalmazásra megfelelő formában készítik.

25. A 15. igénypont szerinti gyógyszer összetétel, azzal jellemezve, hogy az X_5 , a prolin kivételével lehet bármely, a természetben előforduló aminosav.

26. A 15. vagy 25. igénypont szerinti gyógyszer összetétel, azzal jellemezve, hogy az Y_1 és /vagy Y_2 , az Asn kivételével lehetnek bármely, a természetben előforduló aminosavak.

27. A 15. igénypont szerinti gyógyszer összetétel, azzal jellemezve, hogy az

X_1 -lehet Phe, Ala, His, Thr, Ser, Asn vagy Tyr

X_2 -lehet Tyr, Thr, Glu, Asp, Ala, His, Ser vagy Phe

X_3 -lehet Pro, Glu, Asp, Ser, Thr vagy His

X_5 -lehet Lys, Thr, Ser, Ala, Asp vagy Glu

X_6 -lehet Thr-OH, Ser-OH, Ala-OH, Asp-OH, Glu-OH,
vagy -OH illetve az X_5 és X_6 együtt képezik a C-terminális hidroxil csoportot.

Y_1 -lehet Asn, Asp, Gly, Ser, Glu vagy Ala

Y_2 -lehet Asn, Gln, Glu vagy Asp

28. A 15. igénypont szerinti gyógyszer összetétel, azzal

jellemezve, hogy

- X_1 -lehet Phe, Ala, His, Thr, Ser, Asn vagy Tyr
- X_2 -lehet Tyr, Thr, Glu, Asp, Ala, His, Ser vagy Phe
- X_3 -lehet Pro, Glu, Asp, Ser, Thr vagy His
- X_5 -lehet Lys, Thr, Ser, Ala, Asp vagy Glu
- X_6 -OH csoport
- Y_1 -lehet Asn, Asp, Ala, Gly, Ser, Glu vagy Ala
- Y_2 -lehet Asn, Gln, Glu vagy Asp.

29. A 15. igénypont szerinti gyógyszer összetétel, azzal jellemezve, hogy

- X_1 -lehet Phe, Ala, His, Thr, Ser, Asn vagy Tyr
- X_2 -lehet Tyr, Thr, Glu, Asp, Ala, His, Ser vagy Phe
- X_3 -lehet Pro, Glu, Asp, Ser, Thr vagy His
- X_5 és X_6 együtt képezik a C-terminális hidroxici-csoportot
- Y_1 -lehet Asn, Asp, Gly, Glu, Ser vagy Ala és
- Y_2 -lehet Asn, Gln, Glu vagy Asp.

30. A 15. igénypont szerinti gyógyszer összetétel, azzal jellemezve, hogy az X_1 Phe; az X_2 Tyr; X_3 Thr, X_5 Lys; az X_6 Thr-OH; az Y_1 lehet Asn, Asp, Ser vagy Gly és az Y_2 lehet Asn, Gln, Asp vagy Glu.

31. A 15. igénypont szerinti gyógyszer összetétel, azzal jellemezve, hogy az X_1 Tyr; az X_2 Thr; X_3 Pro; az X_5 Thr; az X_6



-OH csoport; Y_1 lehet Asn, Asp, Ser vagy Gly és az Y_2 lehet Asn, Gln, Asp vagy Glu.

32. A 15. igénypont szerinti gyógyszer összetétel, azzal jellemezve, hogy az X_1 az Phe; X_2 az Thr; X_3 az Pro; az X_5 az Thr; az X_6 az -OH csoport; Y_1 lehet Asn, Asp, Ser vagy Gly és az Y_2 lehet Asn, Gln, Asp vagy Glu.

33. A 15. igénypont szerinti gyógyszer összetétel, azzal jellemezve, hogy az X_1 az Phe; X_2 az Tyr; X_3 az Pro; az X_5 az Thr; X_6 az -OH csoport; Y_1 lehet Asn, Asp, Ser vagy Gly és Y_2 lehet Asn, Gln, Asp vagy Glu.

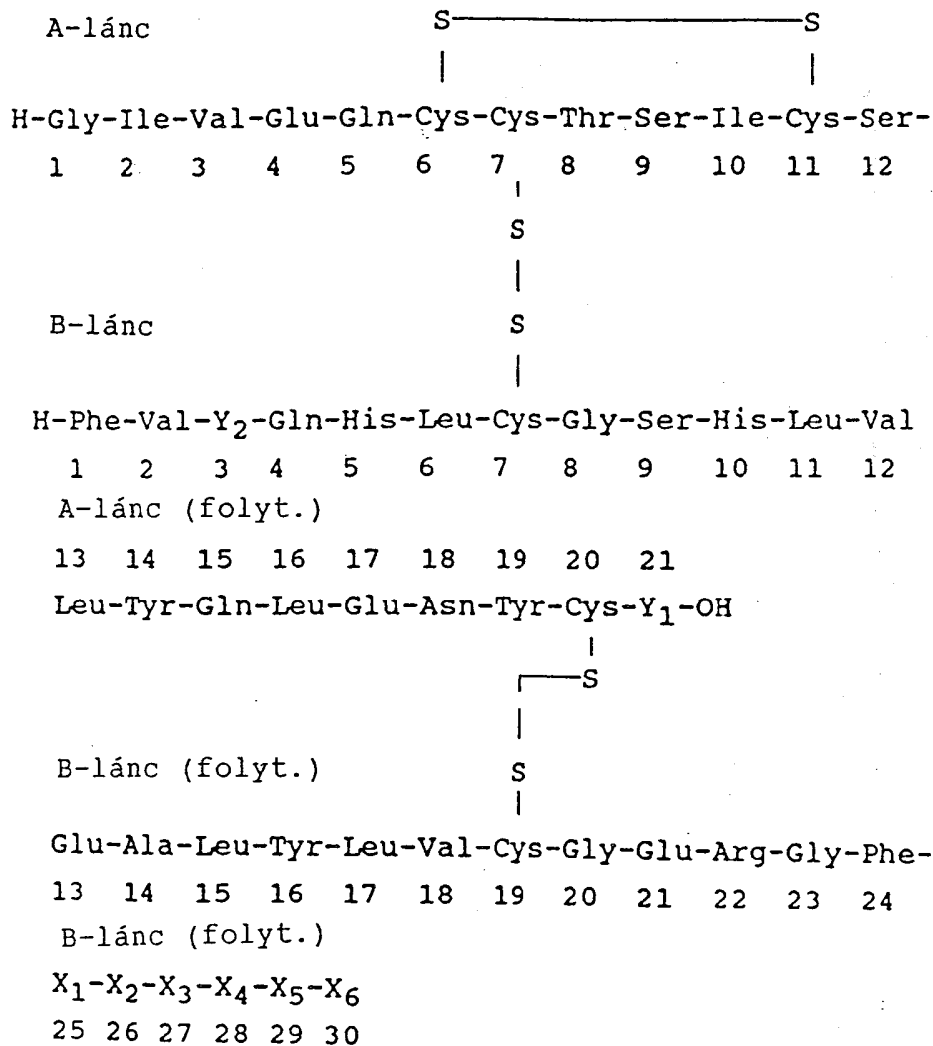
34. A 15. igénypont szerinti gyógyszer összetétel, azzal jellemezve, hogy az X_1 aminosav töltés nélküli és gamma-helyzetben tartalmaz egy sp^2 -hibridállapotú szén atomot és az X_6 egy -OH csoport.

35. A 34. igénypont szerinti gyógyszer összetétel, azzal jellemezve, hogy az Y_1 és Y_2 az Asn kivételével lehetnek bármilyen természetben előforduló aminosav származékok és X_5 a Thr kivételével lehet bármelyik a természetben előforduló aminosav származék.

36. A 34. igénypont szerinti gyógyszer összetétel, azzal jellemezve, hogy az X_5 és X_6 együtt képezik az -OH csoportot.

37. Eljárás a cukorbetegség (Diabetes mellitus) kezelésé-

re az alábbi képlettel jellemzett emberi inzulin analógot tartalmazó gyógyszer összetétel alkalmazásával:



ahol az X₁, X₂, X₃, X₅, Y₁ és Y₂ természetben előforduló aminosav származék; X₄ Lys vagy Arg; és X₆ bármely természetben előforduló aminosav származék, amely C-terminális hidroxil-csoportot vagy -OH-t hordoz vagy az X₅ és X₆ együtt képezik a hidroxil-csoportot vagy a gyógyszeriparilag elfogadható sóik és a gyógyszeriparilag elfogadható hordozók.



38. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a nevezett inzulin analóg a $\text{pH}=7.3$ értéken alacsony oldhatóságot mutat.

39. A 38. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a nevezett inzulin analóg szükségszerűen monomer.

40. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a nevezett gyógyszer összetétel vizes oldat formájában készül.

41. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a gyógyszer összetétel vizes szuszpenzió formájában készül.

42. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a gyógyszeriparilag elfogadható hordozó egy izotóniás vizes oldat.

43. A 40., 41. vagy 42. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy vizes oldat, vizes szuszpenzió vagy az izotóniás vizes oldat tartalmaz még cink ionokat és/vagy puffert (acetát vagy citrát) és/vagy tartósítószer, mint m-krezol, metil-paraben vagy fenol.

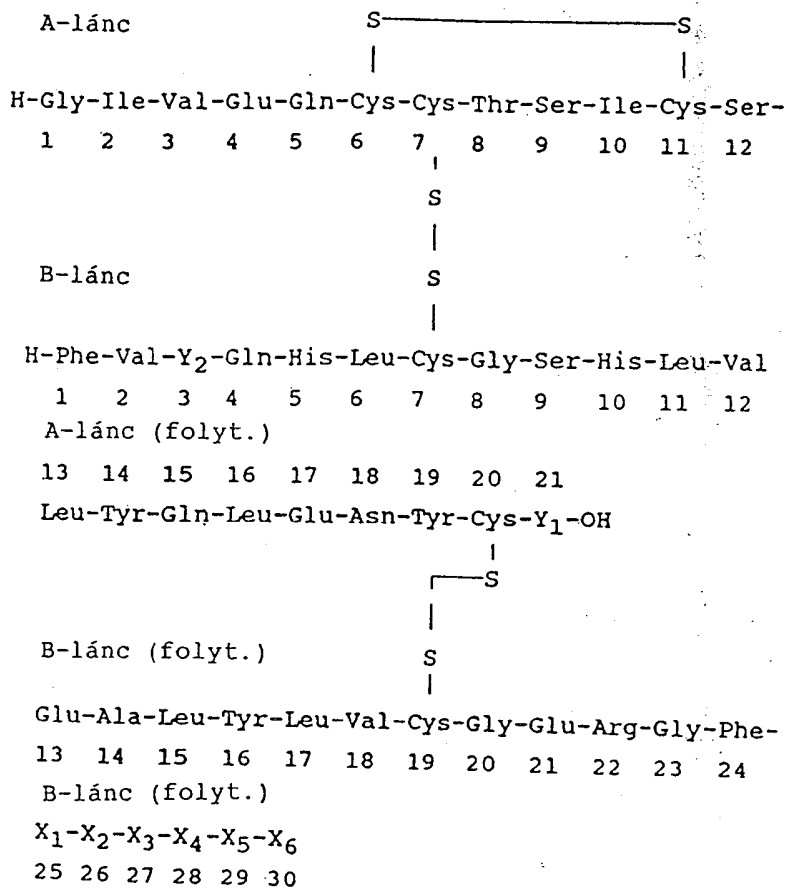
44. A 37. igénypont szerinti gyógyszer összetétel, azzal jellemezve, hogy több mint egy inzulin analógot tartalmaz.

45. A 37. igénypont szerinti gyógyszer összetétel, azzal

jellemezve, hogy szájon át adható vagy bőr alá történő injekcióra alkalmas formában készítik.

46. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy parenterális alkalmazásra megfelelő formában készítik.

47. A következő képlettel jellemzett emberi inzulin analóg készítésének folyamata:



ahol az X₁, X₂, X₃, X₅, Y₁ és Y₂ természetben előforduló aminosav származék; X₄ Lys vagy Arg; és X₆ bármely természetben előforduló aminosav származék, amely C-terminális hidroxici csoportot vagy -OH-t hordoz vagy az X₅ és X₆ együtt képezik a hidroxici



csoportot, azzal jellemezve, hogy a kérdéses inzulin analóg prekuzort kódoló DNS szekvenciát egy megfelelő élesztő expressziós vektorba klónozzák, amely miután betranszformálták az élesztőbe, képes expresszálni és kiválasztani az inzulin analóg prekuzorát, amelyben [Lys^{B28}], [Arg^{B28}], [Lys^{B29}] vagy [Arg^{B29}] van a Gly^{A1}-hez kapcsolva egy peptid kötéssel vagy a III-as képlettel jellemzett peptidláncsal,



ahol az R egy n tagszámú aminosav származékot tartalmazó peptidlánc, amikor az n egy 0-tól 33-ig terjedő egész szám, az R(1) pedig Lys vagy Arg, a transzformált élesztő törzset megfelelő táptaljban fermentálva, a prekuzor a fermentációs táptaljból kinyerve, a IV-es képlettel jellemzett

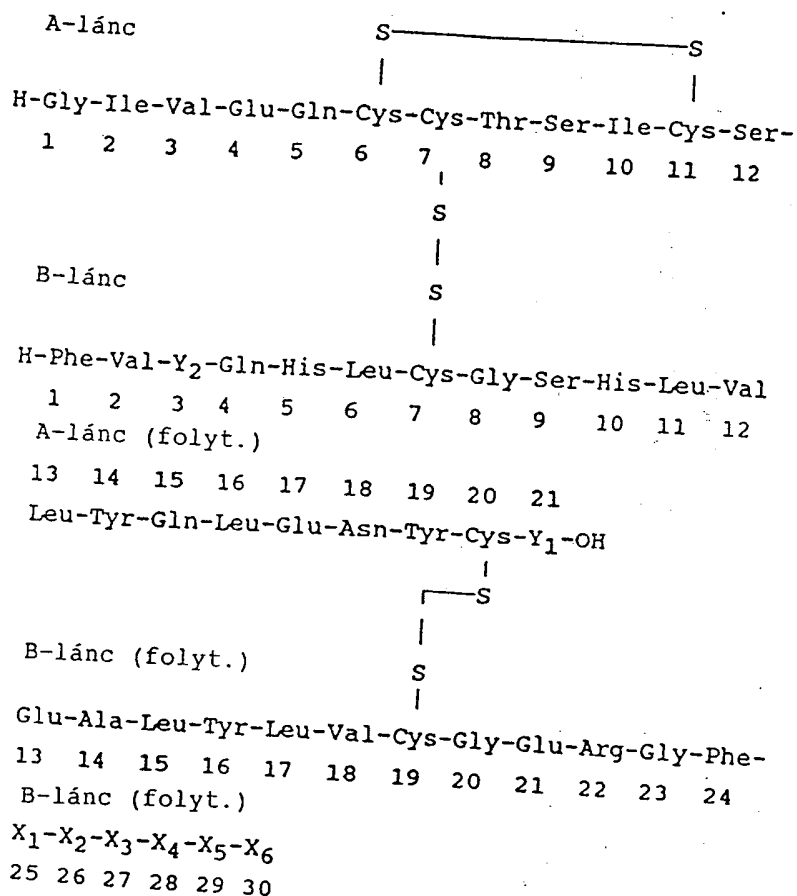


amino vegyülettel reagál, ahol a Q egy aminosav származék, az R'' pedig védő, karboxi-csoport úgymint metil vagy terciérbutil származék, tripszin vagy tripszin szerű enzimet használva katalizátorként víz és szerves oldószer keverékében, miáltal a védő karboxi-csoport eltávozik és az inzulin analógot a reakció elegyből izolálják vagy egy inzulin analóg, amelyben a C-terminális aminosav Lys-től vagy Arg-től különbözik és a prekuzor tartalmaz egy pár bázikus aminosavból (Lys, Arg) álló hidat a C-terminális vég és



a Gly^{A1} között, izolálható és tripszin és karboxipeptidáz B fölhasználásával enzimes kezeléssel alakítják át inzulin analóggá.

48. Az alábbi képlettel rendelkező emberi inzulin analóg készítésének folyamata:



ahol az X₁, X₂, X₃, X₅, Y₁ és Y₂ természetben előforduló aminosav származék; X₄ Lys vagy Arg; és X₆ bármely természetben előforduló aminosav származék, amely C-terminális hidroxici csoportot vagy -OH-t hordoz vagy az X₅ és X₆ együtt képezik a hidroxici csoportot, ahol a des(B23-B30)-emberi inzulin analógot úgy



állítják elő, hogy a (B23-B30) aminosavak lehasításához egy inzulint tripszinnel kezelnek, a kívánt öt-hét aminosavból álló peptidet szintetizálják, és a kapott peptidet párosítják a des(B23-B30)-humán inzulinnal majd a kapott inzulín analógot visszaizolálják a reakció elegyből.

57 oldal

+ 5 rajzoldal

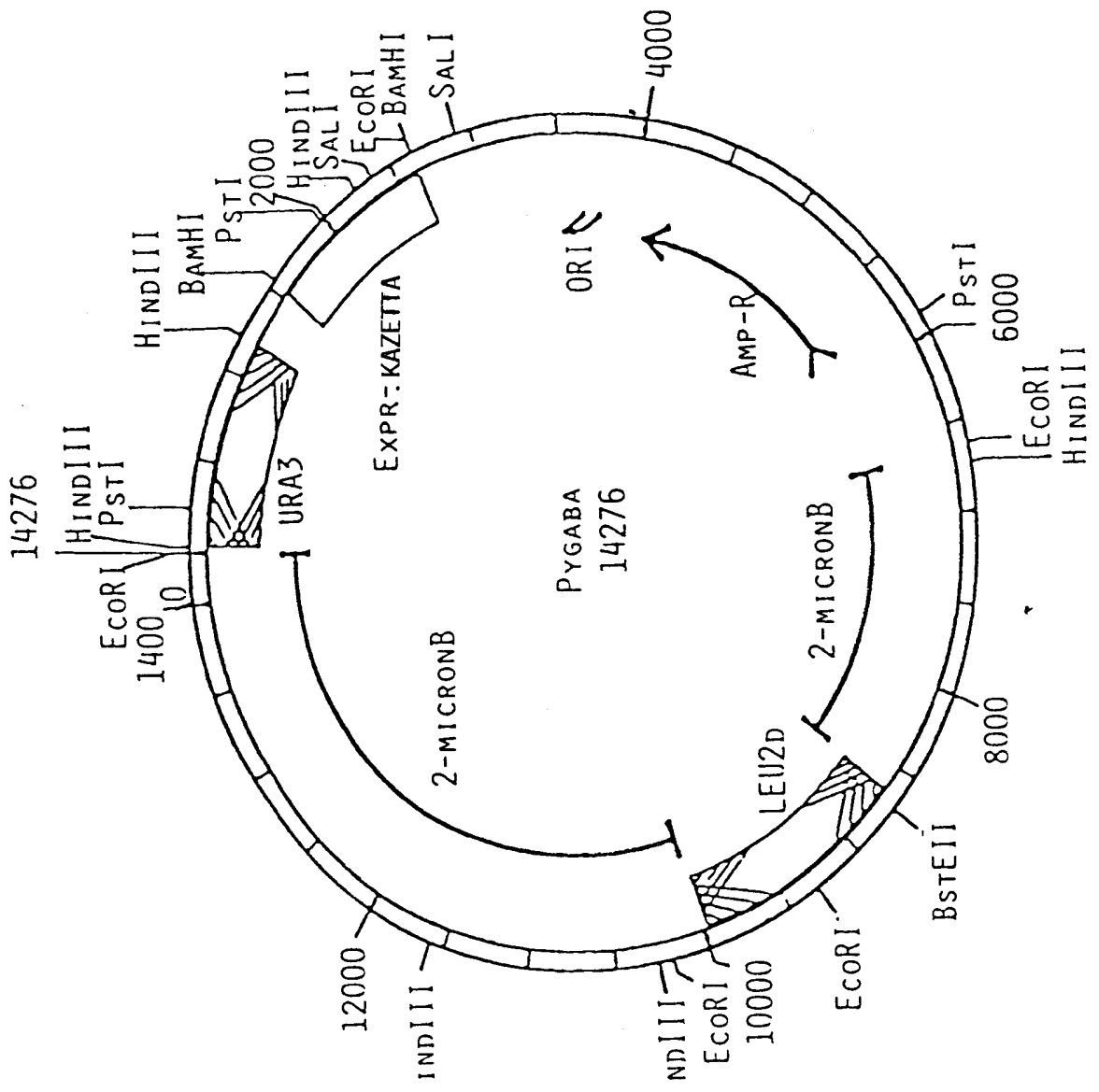
62 oldal

jellemezés aminosavak

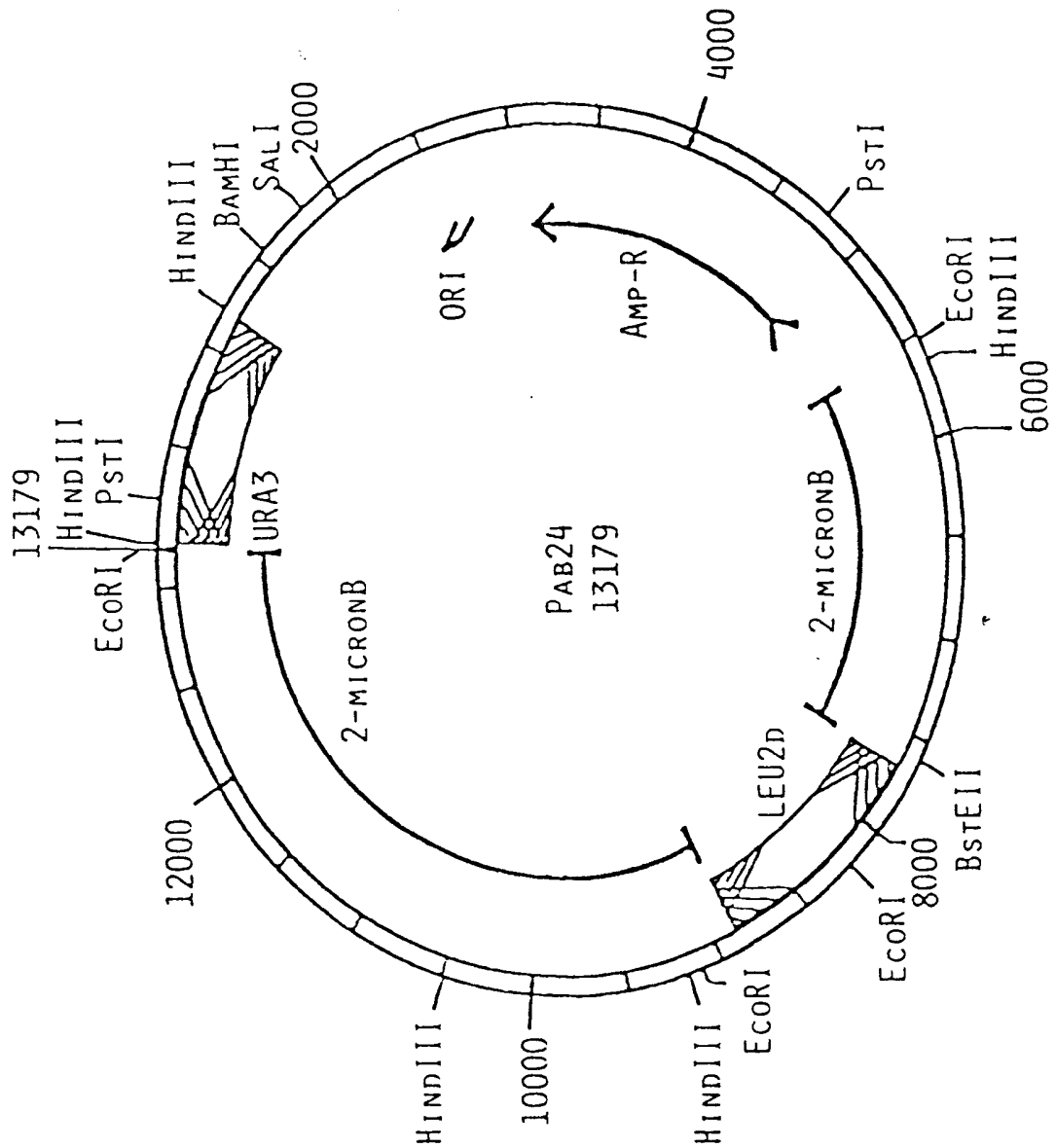
Leif

A meghatalmazott:

S.B.C. & K.
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI
ÉS SZABADALMI IRODA
1061 BUDAPEST, MÁLSZINHÁZ U. 10.
TELEFON: 153-3703



1. ábra



2. ábra

SB.G. & K.
 BUDAPESTI NEMZETI ÜGYVÉDI
 ÉS SZADALMI IRODA
 1061 BUDAPEST, DÁNIELI UTCA 10.
 TELEFON: 133 4733

984 / 90

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

BPT/UK89/00296

3/5

10 20 30 40 50 60
 | | | | | |
 GAATTCCATTCAAGAATAGTTCAAACAAGAAGATTACAAACTATCAATTCATACACAAT

70 80 90 100 110 120
 | | | | | |
 ATAAACGACCAAAGAATGAAGGCTGTTTTCTTGTTTTGTCCTTGATCGGATTCTGCTG

METLysAlaValPheLeuValLeuSerLeuIleGlyPheCysTrp

130 140 150 160 170 180
 | | | | | |
 GGCCCAACCAGTCACTGGCGATGAATCATCTGTTGAGATTCCGGAAGAGTCTCTGATCAT

AlaGlnProValThrGlyAspGluSerSerValGluIleProGluGluSerLeuIleIle

190 200 210 220 230 240
 | | | | | |
 CGCTGAAAACACCACTTTGGCTAACGTCGCCATGGCTAAGAGATTCGTTAACCAACACTT

AlaGluAsnThrThrLeuAlaAsnValAlaMETAlaLysArgPheValAsnGlnHisLeu

250 260 270 280 290 300
 | | | | | |
 GTGCGGTTCCCACTTGGTTGAAGCTTTGTAAGTTGGTTTGCAGTAAAGAGTTTCTTCTA

CysGlySerHisLeuValGluAlaLeuTyrLeuValCysGlyGluArgGlyPhePheTyr

310 320 330 340 350 360
 | | | | | |
 CACCAAGGCTGCTAAGGGTATTGTCGAACAATGCTGTACCTCCATCTGCTCCTTGTACCA

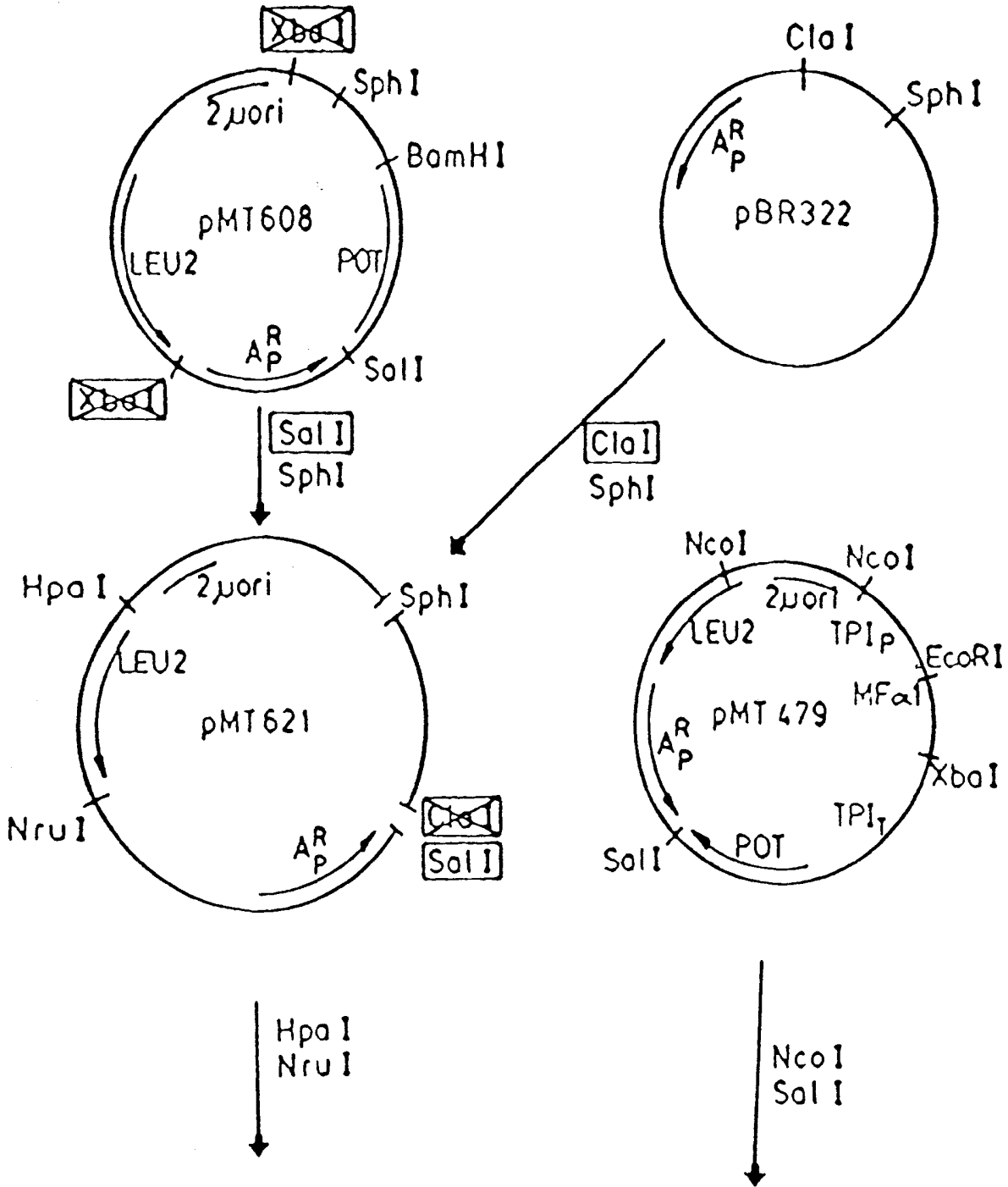
ThrLysAlaAlaLysGlyIleValGluGlnCysCysThrSerIleCysSerLeuTyrGln

370 380 390 400
 | | | |
 ATTGGAAAACACTACTGCAGCTAGACGCAGCCCGCAGGCTCTAGA

LeuGluAsnTyrCysSer

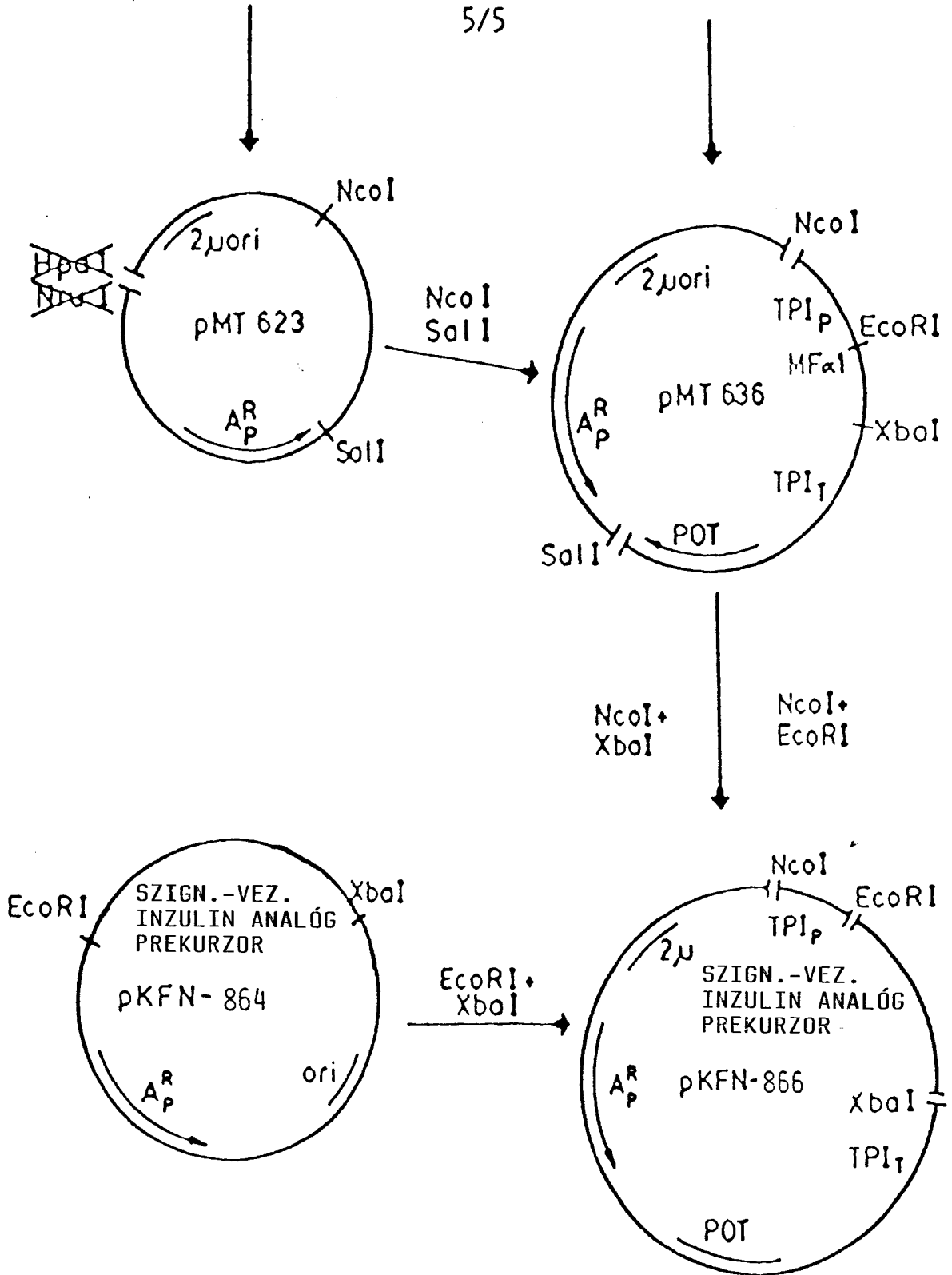
3. ábra

B.G. & K.
 BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI
 ÉS SZABADALMI IRODA
 1061 BUDAPEST, VASMAGYAR U. 10.
 TELEFON: 133730



4. ábr 9

5/5



4. ábra (folytatás)

S.B.G. & K.
 BUDAPESTI NEMZETI JOGI ÜGYVÉDI
 ÉS SZABADALMI IRODA
 1061 BUDAPEST, DOKTOR PÁLYI U. 10.
 TELEFON: 469-0733